



HAL
open science

Modalités du guidage axonal dans le contexte de la régénération du système nerveux central adulte

Noémie Vilallongue

► **To cite this version:**

Noémie Vilallongue. Modalités du guidage axonal dans le contexte de la régénération du système nerveux central adulte. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALV044 . tel-04627611

HAL Id: tel-04627611

<https://theses.hal.science/tel-04627611>

Submitted on 27 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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Neurosciences - Neurobiologie

Unité de recherche : Grenoble Institut des Neurosciences

Modalités du guidage axonal dans le contexte de la régénération du système nerveux central adulte

Axon guidance modalities in the context of adult central nervous system regeneration

Présentée par :

Noémie VILALLONGUE

Direction de thèse :

Marilyn VANTARD
CNRS

Directrice de thèse

Homaira NAWABI
Université Grenoble Alpes

Co-directrice de thèse

Rapporteurs :

Julien FALK

CHARGE DE RECHERCHE HDR, CNRS délégation Rhône-Auvergne

Alexandra REBSAM

CHARGE DE RECHERCHE HDR, INSERM délégation Ile-de-France

Thèse soutenue publiquement le **8 septembre 2023**, devant le jury composé de :

Marilyn VANTARD

DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS délégation Alpes

Directrice de thèse

Julien FALK

CHARGE DE RECHERCHE HDR, CNRS délégation Rhône-Auvergne

Rapporteur

Alexandra REBSAM

CHARGE DE RECHERCHE HDR, INSERM délégation Ile-de-France

Rapporteuse

Emilie PACARY

CHARGE DE RECHERCHE HDR, INSERM délégation Nouvelle-Aquitaine

Examinatrice

Xavier NICOL

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Paris Centre

Examineur

Mireille ALBRIEUX

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Présidente

Invités :

Homaira Nawabi

DOCTEUR EN SCIENCES HDR, Inserm U1216 - Grenoble Institut des Neurosciences



REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon encadrante Homaira Nawabi. Merci d'avoir misé sur moi le jour de mon entretien de stage de M1. Grâce à cela j'ai pu réaliser mes deux stages de master ainsi que ma thèse dans ta belle équipe. Je suis fière de faire partie de la team 16/20. Merci de m'avoir fait confiance en me donnant l'occasion de travailler sur de nombreux projets dont on récolte les fruits maintenant. Merci de m'avoir fait participer à de nombreux congrès et conférences aux 4 coins de la planète en si peu de temps (merci le COVID). En travaillant à tes côtés, j'ai acquis de nombreuses connaissances scientifiques et techniques mais aussi sur les ficelles du monde de la recherche. Je pense avoir grandi au cours de ces 6 années passées dans l'équipe d'un point de vue scientifique (ouverture d'esprit et (très) nombreuses techniques) mais aussi humain (encadrement des plus jeunes, confiance en moi, présentations diverses). Grâce à tout cela, j'ai construit une expérience solide qui me permet de prétendre à des prix, des financements et des post-docs hyper enthousiasmants ! Merci pour ta confiance, ton aide, ton temps et tes conseils. Merci aussi pour toutes les discussions scientifiques (ou non) que l'on a pu avoir au fil de ces années. Merci pour tout !

Je voudrais remercier ensuite Marylin Vantard, ma co-encadrante de thèse pour avoir accepté de tenir ce rôle tout au long de ma thèse. Merci d'avoir participé à mes comités de suivi de thèse ainsi qu'à ma soutenance. Merci pour votre écoute et tous vos conseils.

Je remercie également Stéphane Belin pour sa présence tout au long de mon parcours. Merci de m'avoir donné l'opportunité de débiter dans l'équipe lors de mon stage de M1. Merci pour tes conseils et ton écoute (mais aussi pour tes blagues : sauf celles du vendredi !).

Je souhaite ensuite remercier Mireille Albrieux d'avoir été présente tout au long de mon master et de ma thèse. Merci d'avoir été ma référente lors de mes CSI et la présidente de mon jury lors de ma soutenance de thèse. Un grand merci pour tes conseils, ta gentillesse et ta bienveillance.

J'aimerais également remercier l'ensemble de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Merci à Alexandra Rebsam et Julien Falk pour avoir lu et corrigé mon manuscrit de thèse. Merci pour vos précieux conseils et commentaires. Merci à Emilie Pacary d'avoir si gentiment accepté d'être examinatrice lors de ma soutenance. Merci à Xavier Nicol d'avoir fait partie de mon jury de thèse mais aussi de mon jury de CSI. Merci pour tes précieux conseils, ton aide pour mes différentes demandes de bourses et de prix et ta bienveillance. Merci également à Julien Courchet d'avoir fait partie de mon jury de CSI et de m'avoir aiguillé tout au long de ma thèse.

Je voudrais maintenant remercier les (précieux) collègues que j'ai eu la chance d'avoir durant toutes ces années, en commençant par Julia Schaeffer. Merci Julia d'être devenue ma binôme, mon tandem pendant ma thèse. Merci d'avoir partagé toutes tes expériences avec moi (passées, scientifiques et personnelles). J'ai grandi et évolué à tes côtés tout au long de ma thèse. J'espère continuer de mettre à profit tes précieux conseils et astuces pour la suite de mon parcours. En plus d'être ma super partner in lab, tu es devenue ma grande amie. Nos ressemblances dans nos réflexions et notre manière d'envisager les choses nous ont tant rapprochées. Merci pour tous ces moments passés ensemble au labo et ailleurs, pour toutes nos discussions et éclats de rire. J'ai adoré travailler avec toi pendant toutes ces années et

j'ai hâte de savoir ce que l'avenir nous réserve ! Merci pour tout ma Juju et que l'aventure continue !

Je voudrais ensuite remercier Céline Delpech d'avoir été ma complice et mon amie pendant mon master et ma thèse. Merci pour tous tes conseils, ton soutien et ton oreille attentive. Je suis ravie d'avoir partagé tous ces moments avec toi au labo et dans nos vies personnelles. Merci de m'avoir conviée dans des moments de vie si précieux comme ton mariage et la rencontre d'Arthur. Merci pour tous les fous rires que l'on a pu avoir et ta bonne humeur quotidienne ! Je n'oublierai jamais notre super trio CJN, le bureau de rêve ! Merci pour tout ma Célinou et il ne nous reste plus qu'à briller !

Merci aussi à Charlotte Decourt d'avoir fait partie de mon aventure de thèse. Merci pour ton écoute et tes conseils. J'espère avoir pu te soutenir dans les moments down. Petits thésillons que nous étions sont devenus grands ! Je te souhaite le meilleur pour ton post-doc londonien !

J'aimerais également remercier Monia pour tous les moments que nous avons passés ensemble. Merci pour ta bonne humeur, ton soutien (et ta folie !). Merci d'avoir partagé ton expérience avec moi ainsi que tous tes conseils !

Merci à Béa (la sage) d'avoir gravité autour de moi depuis mon arrivée au GIN. Merci pour ton expertise mais surtout pour ton oreille attentive et tes précieux conseils sur la science mais aussi la vie en général.

Je voudrais maintenant remercier les « nouveaux » thésards de l'équipe 16/20. Merci à Apolline, Samuel et Mickaël de m'avoir fait confiance dans leur début de formation. Merci pour les temps du midi, les soirées bars et les moments labos et bureaux qui se transforment en rigolade ! Merci particulièrement à Apolline d'être devenue ma nouvelle co-bureau : merci pour ta bonne humeur, ton enthousiasme et ta folie douce !

Merci également à Ana et Célestin pour leur aide depuis leur arrivée dans l'équipe. Merci pour votre implication et votre bonne humeur !

Je voudrais aussi remercier des personnes qui ne sont plus présentes au GIN mais avec qui j'ai partagé de très bons moments. Parmi eux : Léa, la stagiaire toulousaine souriante, drôle et très à l'écoute. Merci aussi à Elise Plissonnier, Antoine Paccard et Blandine Excoffier pour leur travail dans l'équipe mais surtout leur gentillesse. Merci pour tous les moments funs au labo et au bar !

Merci également à Cricri (qui m'a sauvée lors de l'impression de ma thèse d'ailleurs), à Sacnité, à Jean-Marc et à Nora pour leur gentillesse et nos discussions à l'improviste dans les couloirs du GIN.

Merci à Amélie Danfossy, Nathalie Scher, Véronique Raymond et Cécile Massit qui m'ont accompagnée tout au long de ma thèse depuis le 3^{ème} étage.

Merci à Georges, Nicolas et Dominique pour tous les services rendus et leur disponibilité sans faille.

Merci à Fabien, Sylvain, Flore, Laure et Samy pour leur aide et leur patience à l'animalerie.

Je voudrais ensuite remercier ma belle-famille pour leur écoute et leur soutien. Merci d'avoir suivi mon parcours en thèse et d'avoir même assisté à mes présentations ! Mention spéciale pour Alice : merci de t'être toujours intéressée à mon parcours, de m'avoir soutenue et motivée

dans les moments difficiles. Merci d'avoir été ma partenaire d'écriture de thèse, merci pour tout ma Lily !

Merci également à mes amis Guy, Rudy, Kévin et Nina pour s'être intéressés à mon parcours et pour m'avoir soutenue depuis un long moment déjà !

Je veux ensuite dire un grand merci à mes parents, Marie et Olivier, merci de m'avoir permis de réaliser tout ce que j'ai pu faire dans ma vie depuis toute petite. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir soutenue même dans les moments les plus difficiles. Merci d'être là.

Merci à ma sœur Emilie de croire en moi depuis toujours et d'être persuadée que j'aurai un prix Nobel un jour ! Merci pour ta présence et pour tout, merci d'être ma sœur.

Merci à toute ma famille d'être présente pour moi et de me soutenir depuis toujours. Je pense à Tonton Jérôme, Tatie Alex, Marie et Jean. Merci à mes grands-parents Mamie Annie, Papy René et Mamie Carmen d'être fiers de mes accomplissements et de suivre mon parcours même très éloigné de leur expérience. Merci à Papy Manuel de m'avoir soutenue et d'être parti en étant persuadé de ma future réussite.

Et enfin, je voudrais remercier infiniment Ben de m'avoir accompagnée dans cette grande aventure qu'est la thèse. Cette thèse est aussi à toi. Merci pour ton soutien de tous les jours, merci de me rassurer quotidiennement. Merci pour ta gentillesse et ta compréhension. Merci d'avoir compris que le quart d'heure Noémie (et Julia) équivaut à 1h30, et merci de ne pas nous en vouloir ! Merci pour tout et j'ai hâte de commencer notre nouvelle aventure canadienne avec toi !

SOMMAIRE

RESUME	7
ABSTRACT	8
TABLE DES MATIERES	9
TABLE DES FIGURES	13
LISTE DES ABBREVIATIONS	14
PREAMBULE	16
INTRODUCTION	17
OBJECTIFS DU PROJET DOCTORAL	95
RESULTATS	
Article 1 : Guidance landscapes unveiled by quantitative proteomics to control reinnervation in adult visual system	96
Article 2 : Mature axon guidance during central nervous system regeneration	131
DISCUSSION et PERSPECTIVES	180
REFERENCES	191
ANNEXES	
Article : Customization of translational complex regulates mRNA-specific translation to control CNS regeneration.	223
Perspective : Visual system repair : what's next ?	292
Perspective : Axon guidance in regeneration of the mature central nervous system: step by step	296

RESUME

Modalités du guidage axonal dans le contexte de la régénération du système nerveux central adulte

Toutes lésions du système nerveux central (SNC - cerveau et moelle épinière) adulte conduisent à des pertes de fonctions cognitives, sensorielles et/ou motrices irréversibles. En effet, il n'existe à ce jour aucun traitement pour réparer le SNC. C'est pourquoi la compréhension des mécanismes sous-jacents de la régénération axonale constitue un défi majeur pour la neurobiologie ainsi que pour la santé publique.

Aujourd'hui, la régénération à longue distance (de l'œil jusqu'au cerveau) est possible par la modulation de voies moléculaires spécifiques dans les neurones. Cependant, les axones qui régénèrent présentent de graves défauts de projection qui compromettent un retour des fonctions pour deux raisons majeures : l'absence de réinnervation des cibles et la potentielle formation de circuits aberrants délétères. De ce fait, le guidage axonal apparaît comme un mécanisme clé à moduler afin de permettre la correcte reformation du circuit lésé.

Durant ma thèse, j'ai mis en évidence que le système nerveux mature exprime encore les molécules impliquées dans le guidage axonal, un processus du développement qui permet la mise en place correcte des circuits neuronaux.

De manière intéressante, j'ai montré que dans le système visuel (appartenant au SNC), la modulation de facteurs de guidage spécifiques permet de modifier la trajectoire des axones en cours de régénération et de les diriger vers leurs cibles d'origine. Dans la suite de mes travaux, j'ai mis en évidence la fonctionnalité du circuit nouvellement formé. Ainsi, mon projet permet de souligner l'importance du guidage axonal lors de la régénération du système nerveux dans le but de reconstruire des circuits fonctionnels. Ces avancées pourront s'appliquer au développement de thérapies innovantes dans le cadre des lésions du SNC mais aussi des maladies neurodégénératives.

Mots clés : rétine, chiasma, noyau suprachiasmatique, guidage axonal, cellules ganglionnaires, système nerveux central, régénération

ABSTRACT

Axon guidance modalities in the context of adult central nervous system regeneration

Any lesion to the adult central nervous system (CNS - brain and spinal cord) leads to irreversible loss of cognitive, sensitive and/or motor functions. Indeed, there is still no treatment available to repair the CNS. Therefore, understanding the underlying mechanisms of axonal regeneration is a major challenge for neurobiology and public health.

Today, long-distance regeneration (from the eye to the brain) is possible through the modulation of neuron-specific molecular pathways. However, regenerating axons present severe guidance defects that jeopardize functional recovery, for two main reasons: the lack of targets reinnervation and the potential formation of aberrant deleterious circuits. Hence, axonal guidance appears as a key mechanism to be modulated in order to obtain the correct circuit formation.

During my thesis, I highlighted that the mature nervous system is still expressing the molecules involved in axonal guidance, a process related to the development that allows the correct formation of neuronal circuits.

Interestingly, I showed that the modulation of specific guidance factors within the visual system (that belongs to the CNS) allows to modulate the regenerating axons trajectories. In the following steps, I assessed the functionality of the newly-formed circuit. Thus, my project highlights the axonal guidance key role during nervous system regeneration in order to rebuild functional circuits. These breakthroughs will be of crucial importance to develop innovative therapies to repair lesioned CNS but also for neurodegenerative diseases.

Key words: retina, chiasm, suprachiasmatic nucleus, axon guidance, retinal ganglion cells, central nervous system, regeneration

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	17
Chapitre 1 : Régénération du système nerveux	17
I- Système nerveux central et système nerveux périphérique	17
II- Les modèles d'étude de la régénération	18
A- Les axones sensoriels de la colonne dorsale dans les modèles murins	19
B- Les ganglions dorso-rachidiens	19
C- Les axones corticospinaux	19
D- Les axones des cellules ganglionnaires de la rétine	20
III- Le système visuel	20
A - La rétine	20
Les cellules ganglionnaires de la rétine (ou CGR)	22
A.1- Les cellules ganglionnaires sélectives de la direction ON-OFF	22
A.2- Les cellules ganglionnaires de la rétine sélectives de la direction ON	23
A.3- Les cellules ganglionnaires de la rétine alpha (α -CGR)	23
A.4- Les cellules ganglionnaires de la rétine intrinsèquement photosensibles (CGRip ou ipRGC)	24
A.5 – Hétérogénéité des CGR dans la réponse à la lésion et la régénération	26
B - Les cibles cérébrales du système visuel	26
B.1- Le noyau suprachiasmatique (NSC, « suprachiasmatic nucleus » or SCN)	27
B.1.1- Les rythmes circadiens	27
B.1.2- Les afférences du noyau suprachiasmatique	28
B.1.3- Les efférences du noyau suprachiasmatique	29
B.2- Le corps genouillé latéral dorsal (dLGN)	31
B.3- Le colliculus supérieur (SCol)	31
IV- Différence de capacités régénératives des systèmes nerveux central et périphérique	32
A- Système nerveux périphérique	33
B- Système nerveux central	33
1. L'environnement du système nerveux central est inhibiteur de la régénération... 33	
a- La myéline : un des principaux inhibiteurs de la régénération	34
Les inhibiteurs associés à la myéline - MAI	34
(i) Nogo	34
(ii) OMgp	34
(iii) MAG	34
b- La cicatrice gliale	35

b.1 - La microglie	36
b.2 - Les oligodendrocytes survivants	37
b.3 - Les cellules progénitrices d'oligodendrocytes.....	38
b.4 - Les astrocytes	38
b.4.1- Les astrocytes : composants majoritaires de la cicatrice gliale.....	38
b.4.2- Les astrocytes sécrètent des molécules inhibitrices à la régénération ...	38
b.4.2.1- CSPG – protéoglycane de sulfate de chondroïtine – inhibiteurs de la repousse axonale	38
b.4.2.2- Autres facteurs sécrétés par les astrocytes	39
b.4.3- Initiation de la réponse immunitaire par les astrocytes	39
b.5 - Les fibroblastes.....	39
c- Autres inhibiteurs à la régénération du système nerveux central	39
c.1 – Les sémaphorines.....	40
c.2- Les éphrines	41
c.3- Les nétrines	41
c.4- Les Wnt.....	41
c.5- Les Slits	41
c.6- Autres molécules de guidage.....	42
d- La modulation de l'environnement du SNC ne suffit pas pour promouvoir la régénération.....	42
2. Les capacités intrinsèques des neurones du système nerveux central.....	43
a- La voie mTOR	43
b- La voie JAK/STAT	44
c- Les facteurs de transcription	45
d- Les modifications épigénétiques	47
e- Les approches combinatoires	47
e.1- Délétion de PTEN et induction de l'inflammation.....	48
e.2- Délétion de PTEN et de SOCS3	49
e.3- Délétion de PTEN et stimulation visuelle	49
e.4- Délétion de PTEN et SOCS3 et surexpression de CNTF et c-myc : modèle PSM	50
V- Défauts de guidage des axones en cours de régénération	50
Chapitre 2 : Le guidage axonal	53
I- Les nétrines	55
a- Découverte des nétrines.....	55
b- Structure des nétrines et de leurs récepteurs	55

c-	Expression et fonctions des nétrines.....	56
c.1-	L'interaction Netrin/DCC a un effet attractif	56
c.2-	L'interaction Netrin/UNC5A-D a un effet répulsif	58
c.3-	L'interaction Netrin/DSCAM peut avoir différents effets	58
II-	Les sémaphorines	58
a-	Catégories et structure des sémaphorines.....	58
b-	Récepteurs des sémaphorines.....	59
c-	Expression et fonctions des sémaphorines	61
III-	Les éphrines.....	61
a-	Structures et récepteurs des éphrines	61
b-	Fonction des éphrines.....	62
IV-	Les Slits.....	64
a-	Structure des Slits et de leurs récepteurs.....	64
b -	Expression et fonctions de Slits.....	64
V-	Autres molécules associées au guidage et mécanismes de formation des circuits neuronaux.....	68
a-	Les molécules d'adhésion	68
b-	Les morphogènes	69
c-	Les protéoglycanes	70
d-	Les lipides	71
e-	Forces physiques.....	71
VI-	Les molécules de guidage dans la formation du système visuel	73
a -	Guidage dans l'œil.....	73
b -	Guidage au chiasma optique	76
c -	Guidage vers les cibles cérébrales	77
1-	Vers le noyau suprachiasmatique	77
2-	Vers le corps genouillé latéral dorsal.....	77
3-	Vers le colliculus supérieur (ou superior colliculus – SCol).....	78
Chapitre 3 :	Le guidage axonal dans le système nerveux mature	80
I-	Rôles physiologiques du guidage axonal chez l'adulte	80
a-	Guidage axonal répulsif dans le système nerveux central adulte.....	80
b-	Inhibition de croissance plutôt que répulsion	82
c-	Manque de guidage dans le système nerveux central adulte	82
II-	Mise en place de l'environnement chez l'adulte	83
a-	Interaction avec la matrice extracellulaire.....	83
b-	Régulation de la mise en place de la cicatrice gliale dans le SNC adulte	84

c-	Connectivité dans le système nerveux périphérique adulte.....	85
d-	Organisation cellulaire dans le système vasculaire adulte.....	86
III-	Les molécules de guidage contrôlent l'identité cellulaire chez l'adulte	87
a-	Communication et signalisation cellulaires dans le système immunitaire adulte	87
b-	Maintenance des niches de cellules souches chez l'adulte.....	87
	Niche de cellules souches neurales	88
IV-	Les fonctions des molécules de guidage chez l'adulte.....	88
a-	Formation des synapses et élagage.....	88
b-	Formation de la mémoire et plasticité.....	89
c-	Modification de l'expression des molécules de guidage et conséquences	91
	c.1- Vieillesse.....	91
	c.2- Troubles neurologiques et maladies neurodégénératives.....	91
V-	Dysfonction moléculaire et cellulaire dans le cancer	92
	Régulation de la signature des cellules cancéreuses	93
	DISCUSSION et PERSPECTIVES	180
I –	Défis techniques.....	181
A –	Approches <i>ex vivo</i>	181
B –	Chirurgie stéréotaxique et modulation des facteurs de guidage <i>in vivo</i>	182
C –	Imagerie.....	183
II –	Conclusions.....	183
III –	Perspectives	185
A –	Régulation spatio-temporelle des molécules de guidage.....	185
B –	Interaction entre les molécules de guidage et régulations.....	185
C –	Hétérogénéité dans la rétine.....	186
D –	Réinnervation des cibles cérébrales	186
1 –	Nombre d'axones nécessaires et leur identité	186
2 –	Projections ipsi- et controlatérales	187
3 –	Cartes rétinotopiques	187
4 –	Stabilité et maintien des synapses.....	188
E –	Myélinisation des axones régénérés	188
F –	Être prudent en modulant les molécules de guidage	189
1 –	Ne pas affecter les fonctions physiologiques des molécules de guidage chez l'adulte	189
2 –	Attention aux conséquences	189

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Le système nerveux	18
Figure 2 : Structure de l'œil et de la rétine	21
Figure 3 : Le système visuel	29
Figure 4 : Structure et afférences des cibles cérébrales des cellules ganglionnaires de la rétine	30
Figure 5 : La cicatrice gliale	36
Figure 6 : Les modèles de régénération faisant intervenir la voie mTOR	48
Figure 7 : Modèle PSM de régénération à longue distance et défauts de guidage engendrés	51
Figure 8 : Principe du guidage axonal au cours du développement	54
Figure 9 : Les nétrines	57
Figure 10 : Les sémaphorines	60
Figure 11 : Les éphrines	63
Figure 12 : Les Slits	66
Figure 13 : Guidage dans le système visuel	75
Figure 14 : Rôle des molécules de guidage chez l'adulte.	81

LISTE DES ABBREVIATIONS

ACT	α -1-antichymotrypsine
ALCAM	Activated Leukocytes Cell Adhesion Molecule
Atf3	Activating transcription factor 3
AVP	Arginine vasopressine peptide
Cdh6	Cadhérine 6
CGR	Cellules ganglionnaires de la rétine
CGRip	Cellules ganglionnaires de la rétine intrinsèquement photosensibles
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
Comm	Commissurless
CS	Chondroïtine sulfate
CSPG	Protéoglycane de sulfate de chondroïtine
CST	Tractus cortico-spinal
DCC	Deleted in colorectal carcinoma
dLGN	Dorsal lateral geniculate nucleus – Corps genouillé latéral dorsal
DRG	Dorsal root ganglia – Ganglion dorso-rachidien
DSCAM	Down Syndrome Adhesion Molecule
DSGC	Directionally selective ganglion cells – CGR sélectives de la direction
EMT	Transition épithélium-mésenchyme
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
FP	Floor plate – « plaque du plancher »
Fra	Frazzled
GAG	Glycosaminoglycane
GFAP	Glial fibrillary acidic protein - protéine acide fibrillaire gliale
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GRP	Gastrin-releasing peptide
Hoxd10	Homeobox 10
HS	héparane sulfate
HSC	Hematopoietic stem cell – cellule souche hématopoïétique
Ig	Immunoglobulines
IGL	Intergeniculate leaflet – Feuillet inter-genouillé
IL-6/ IL-11	Interleukine-6 et -11
IPL	Inner plexiform layer – Couche plexiforme interne
JAK	Janus kinase
KLF	Krüppel-like factor
LGN	Lateral geniculate nucleus – corps genouillé latéral
LIF	Leukemia inhibitory factor
MAG	Myelin-associated glycoproteins - Glycoprotéines associées à la myéline
MEC	Matrice extracellulaire
MTN	Medial Terminal Nucleus – Noyau terminal médial
mTOR	mammalian target of rapamycin

NPO	Noyau prétectal olivaire
NrCAM	Neuronal Cell Adhesion Molecule
Nrp	Neuropiline
NSC	Noyau suprachiasmatique
OMgp	Oligodendrocyte myelin glycoproteins
OPCs	Oligodendrocyte precursor cells - cellules précurseurs d'oligodendrocytes
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating peptide
PBg	Noyau parabigéminale
PC	Pheromone convertase
PG	Protéoglycanes
Plex	Plexin
PNN	Perineuronal nets - Filets périneuronaux
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RBPMS	RNA-binding protein with multiple splicing
RGMa	Repulsive guidance molecule A
RHT	Retinohypothalamic tract - Tractus rétino-hypothalamique
SCol	Superior colliculus - Colliculus supérieur
Sema	Sémaphorines
Shh	Sonic hedgehog
siRNA	Small interfering RNA
Smo	Smotherened
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SOCS	Suppressor Of Cytokine Signaling
Sox11	SRY-box containing gene 11
SPRRP1A	Small proline-rich repeat protein 1A
sSC	Couche superficielle du colliculus supérieur
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TNF	Tumor necrosis factor- α
uSCG	Upper stratum griseum superficial
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor A
VIP	Vasointestinal peptide
Zic2	Zinc finger transcription factor 2

PREAMBULE

Contrairement au système nerveux périphérique (SNP), le système nerveux central (SNC) est incapable de régénérer après une lésion. Les conséquences des atteintes du SNC sont donc dramatiques puisqu'elles conduisent à des pertes irréversibles des fonctions motrices, sensorielles et/ou cognitives. Après avoir étudié les différences de capacités régénératives entre le SNP et le SNC, les chercheurs ont montré que la modulation de voies moléculaires spécifiques au sein des neurones permet la régénération à longue distance des axones du SNC.

Cependant, un nouvel obstacle est apparu : le manque de guidage axonal dans le SNC mature. En effet, les axones qui régénèrent ne parviennent pas à reconnecter leurs cibles cérébrales correctes car ils sont perdus. Ceci empêche la reformation des circuits neuronaux et le retour des fonctions.

C'est pourquoi, il est essentiel de comprendre les modalités de guidage axonal chez l'adulte. Pour ce faire, j'ai utilisé le modèle du système visuel adulte, qui fait partie du SNC et qui présente donc la même incapacité de régénération spontanée et j'ai modalisé la lésion du SNC par le pincement du nerf optique.

Afin de recontextualiser les domaines de la régénération et du guidage axonal pour y replacer mon projet doctoral, voici une introduction relatant les mécanismes de régénération dans le système nerveux, du guidage axonal et les rôles des facteurs impliqués dans le guidage chez l'adulte.

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Régénération du système nerveux

I- Système nerveux central et système nerveux périphérique

Le système nerveux contrôle l'ensemble des fonctions du corps. Il est divisé en deux parties : le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP) (**Figure 1**). Le SNC est constitué du cerveau, de la moelle épinière ainsi que deux des douze nerfs crâniens : le nerf I, olfactif et le nerf II, optique. Le SNC assure toutes les fonctions essentielles qu'elles soient cognitives (perception de l'environnement, interaction avec les autres, mémoire, apprentissage ou langage), motrices ou sensorielles (perception de l'environnement grâce aux différents sens). Afin de préserver ce centre de contrôle essentiel, le cerveau est protégé par le crâne et la moelle épinière, par les vertèbres. Le SNC contrôle les différentes fonctions du corps en envoyant des signaux nerveux le long de la moelle épinière. De celle-ci émergent des nerfs et des ganglions qui constituent le système nerveux périphérique (SNP). Ce dernier est lui-même divisé en deux parties : le système nerveux autonome (contrôle des fonctions involontaires telles que la digestion ou la respiration) et le système nerveux somatique (contrôle volontaire des mouvements). C'est la communication entre SNC, SNP et leurs cellules partenaires qui assure la bonne fonctionnalité de notre corps.

Outre leur composition, ces deux systèmes se différencient également par leur réponse à la lésion axonale. En effet, même si le SNC est très protégé, il peut être endommagé par des lésions traumatiques ou chroniques (maladies neurodégénératives). Dans ces cas-là, le cerveau et/ou les nerfs sont lésés partiellement ou alors totalement sectionnés. Les conséquences de ces atteintes sont irréversibles : pertes de fonctions motrices, cognitives et/ou sensorielles. En effet, le SNC est incapable de régénérer après une lésion. Par opposition, le SNP a une certaine capacité de réparation, ce qui permet les opérations très spectaculaires, comme les greffes de membres. Cette différence de capacité de repousse a largement été étudiée depuis le siècle dernier ([Huebner et Strittmatter 2009](#)).

II- Les modèles d'étude de la régénération

L'objectif du domaine d'étude de la régénération est de promouvoir la repousse axonale afin de reconstruire un circuit neuronal fonctionnel. Les prérequis pour parler de régénération sont (i) une lésion complète de tous les axones qui projettent dans un tractus et (ii) une repousse des axones au-delà du site de lésion. Le défi le plus important du domaine est de réparer une lésion survenant au niveau de la moelle épinière. Ces blessures interrompent les fonctions motrices et sensorielles assurées par les axones présents dans ce tractus.

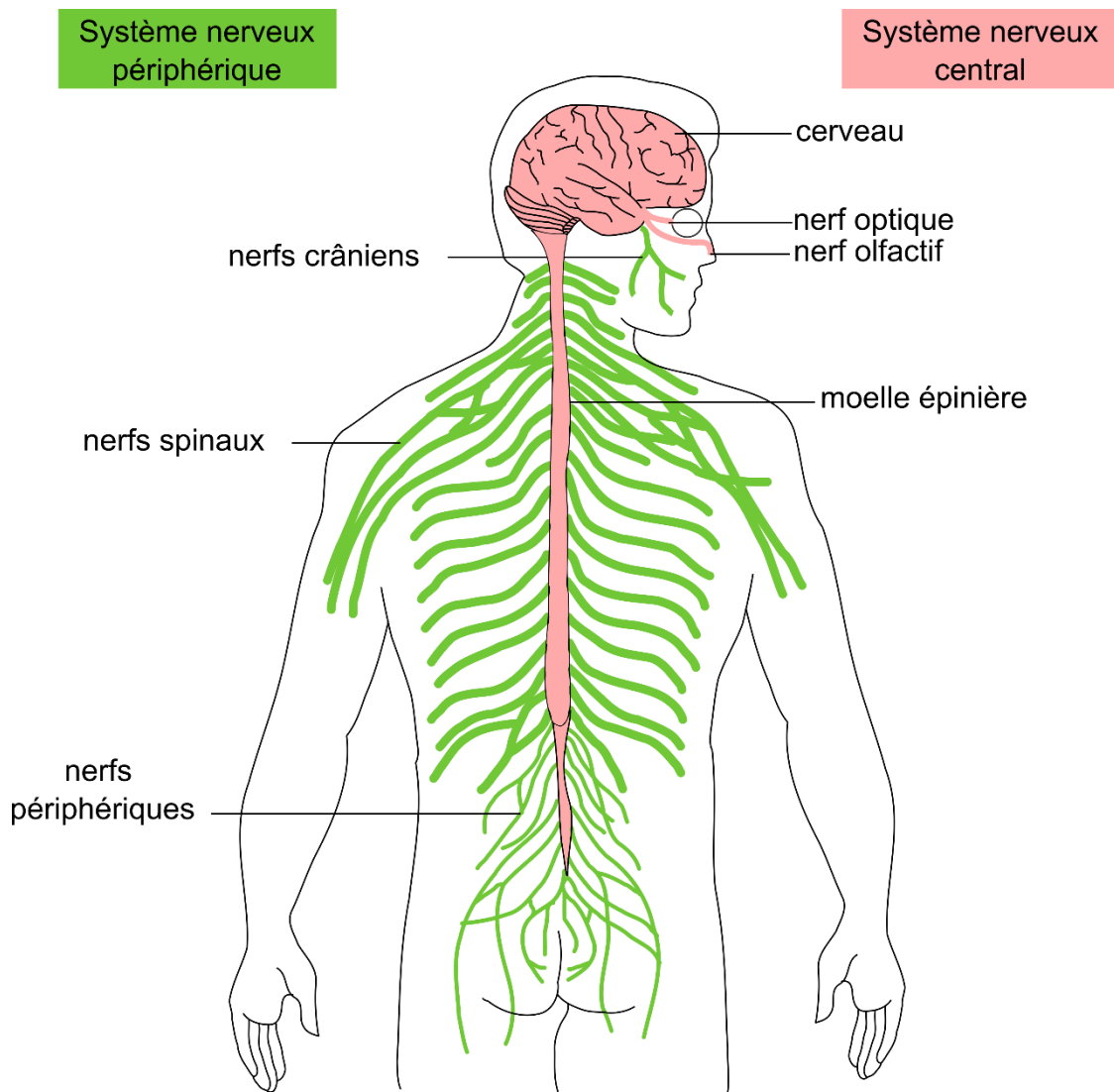


Figure 1 : Le système nerveux

Le système nerveux est constitué du système nerveux central (SNC en rose) et du système nerveux périphérique (SNP en vert). Le SNC est composé du cerveau, de la moelle épinière, des nerfs optique et olfactif. Le SNP contient les nerfs spinaux et les nerfs périphériques.

Afin de comprendre l'effet de la lésion sur le SNC, de le modéliser et de le moduler dans le but de trouver des mécanismes de réparation de ces circuits, de nombreux modèles sont utilisés.

A- Les axones sensoriels de la colonne dorsale dans les modèles murins

La colonne dorsale correspond à la partie dorsale de la moelle épinière. Elle est constituée par les axones ascendants qui communiquent l'information sensorielle des membres et organes au cerveau. Afin de mimer la lésion de ces axones, une transection spécifique de ces fibres est réalisée, la plupart du temps au niveau thoracique puisqu'il s'agit des axones provenant des ganglions dorso-rachidiens situés au niveau lombaire L3 à L5 (voir plus bas). La sévérité de la lésion peut être évaluée grâce à l'injection d'un marqueur axonal dans le nerf sciatique (plus bas que la colonne dorsale) qui est aussi innervé par les neurones des ganglions dorso-rachidiens (L3 à L5) : l'absence de marquage dans le noyau gracilis (plus haut que la colonne dorsale, dans la médulla ou bulbe rachidien) confirmera la bonne réalisation de la transection ([Attwell et al. 2018](#)).

B- Les ganglions dorso-rachidiens

Les ganglions dorso-rachidiens (ou Dorsal Root Ganglia – DRG) représentent un modèle intéressant pour étudier la régénération axonale. Ces ganglions sont situés de part et d'autre de la moelle épinière, tout le long de celle-ci. Les neurones sensoriels des DRG ont la particularité d'être bipolaires : ils possèdent deux axones, un périphérique et un central. En effet, l'axone central projette dans la moelle épinière, tandis que l'axone périphérique innerve les cibles périphériques. Une lésion de la branche périphérique, appartenant au SNP est suivie d'une régénération spontanée. Ce n'est pas le cas de la branche centrale, faisant partie du SNC. Grâce à ce modèle deux mécanismes ont été mis en évidence. Le premier concerne une amélioration de la régénération dans la branche périphérique suite à une première lésion antérieure sur cette même branche : c'est le paradigme de la lésion conditionnée ([McQuarrie et Grafstein 1973](#)). Le deuxième, appelé pré-conditionnement (« pre-conditioning ») est basé sur une première lésion survenant dans la branche périphérique qui induit une activation de programmes pro-régénératifs permettant aux axones de la branche centrale de régénérer à leur tour après une lésion. Grâce à ces particularités, les DRG constituent un modèle important utilisé pour l'étude de la régénération du SNC ([Neumann et Woolf 1999](#)).

C- Les axones corticospinaux

Les axones du tractus corticospinal correspondent aux fibres descendantes qui relaient l'information motrice du cerveau vers la moelle épinière. Les corps cellulaires de ces neurones sont situés dans le cortex sensorimoteur. Les axones projettent dans la moelle épinière au niveau de la colonne dorsolatérale de la substance blanche (tractus principal chez les primates) et au niveau ventral de la colonne dorsale (tractus principal chez les rongeurs). Plutôt que de réaliser une transection complète de la moelle épinière qui constitue une manipulation

très invasive, la plupart des études sur les rongeurs pratiquent des lésions partielles telles que l'hémisection dorsale ou latérale et les contusions (ce modèle se rapprochant d'autant plus des lésions observées chez l'homme). Cependant, dans ces modèles, on observe de nombreux axones qui échappent à la lésion : une lésion incomplète peut laisser intacts quelques axones qui restent connecter à leur cible. Ces axones restants peuvent compromettre l'étude de la régénération, notamment en influençant la repousse. C'est pourquoi d'autres études utilisent l'écrasement de la moelle épinière afin d'avoir une lésion complète (Tuszynski et Steward 2012). Ce tractus est également utilisé afin d'étudier les mécanismes de plasticité qui pourraient jouer un rôle majeur dans le regain des fonctions après une lésion de la moelle. Pour cela, la pyramidotomie unilatérale est utilisée. Elle consiste en la section d'un faisceau pyramidal au niveau de la décussation. Elle permet d'étudier par quels mécanismes et par quelles molécules le faisceau intact peut former des collatérales et innervé des territoires dénervés (Jin et al. 2015).

D- Les axones des cellules ganglionnaires de la rétine

Le nerf optique appartient au SNC et possède donc cette même incapacité à régénérer après une lésion. Le nerf optique étant plus aisément atteignable, sa lésion complète est facilement réalisable et reproductible, en étant moins invasive qu'une lésion de la moelle épinière. C'est pourquoi le modèle du système visuel et du pincement du nerf optique sont largement utilisés dans les études de régénération axonale. Le nerf optique constitue le pont entre les neurones de la rétine et le cerveau. Ce nerf est constitué par les axones des seuls neurones de la rétine à pouvoir projeter dans le cerveau : les cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) (Figure 2-A). C'est ce modèle que j'ai utilisé lors de ma thèse. Ainsi dans les paragraphes suivants, je vais décrire le système visuel de façon plus détaillée.

III- Le système visuel

Le système visuel est constitué des yeux, du nerf optique et des zones du cerveau qui reçoivent et intègrent les informations visuelles (Figure 3). Le nerf optique est responsable de la communication de l'information lumineuse de l'œil jusqu'aux différentes cibles cérébrales connectées par les neurones de la rétine. La lumière est focalisée par la cornée jusque dans la rétine. C'est la rétine qui traduit l'information lumineuse en signaux nerveux transmis au cerveau.

A - La rétine

La rétine est le tissu récepteur de l'information lumineuse qui tapisse le fond de l'œil (Figure 2-B). Elle est constituée de trois couches contenant les corps cellulaires de neurones (couches nucléaires) séparées par deux couches contenant les prolongements neuritiques de ces différentes cellules (couches plexiformes) et leur connections synaptiques. La couche la plus profonde de la rétine contient les photorécepteurs qui sont directement activés par la lumière.

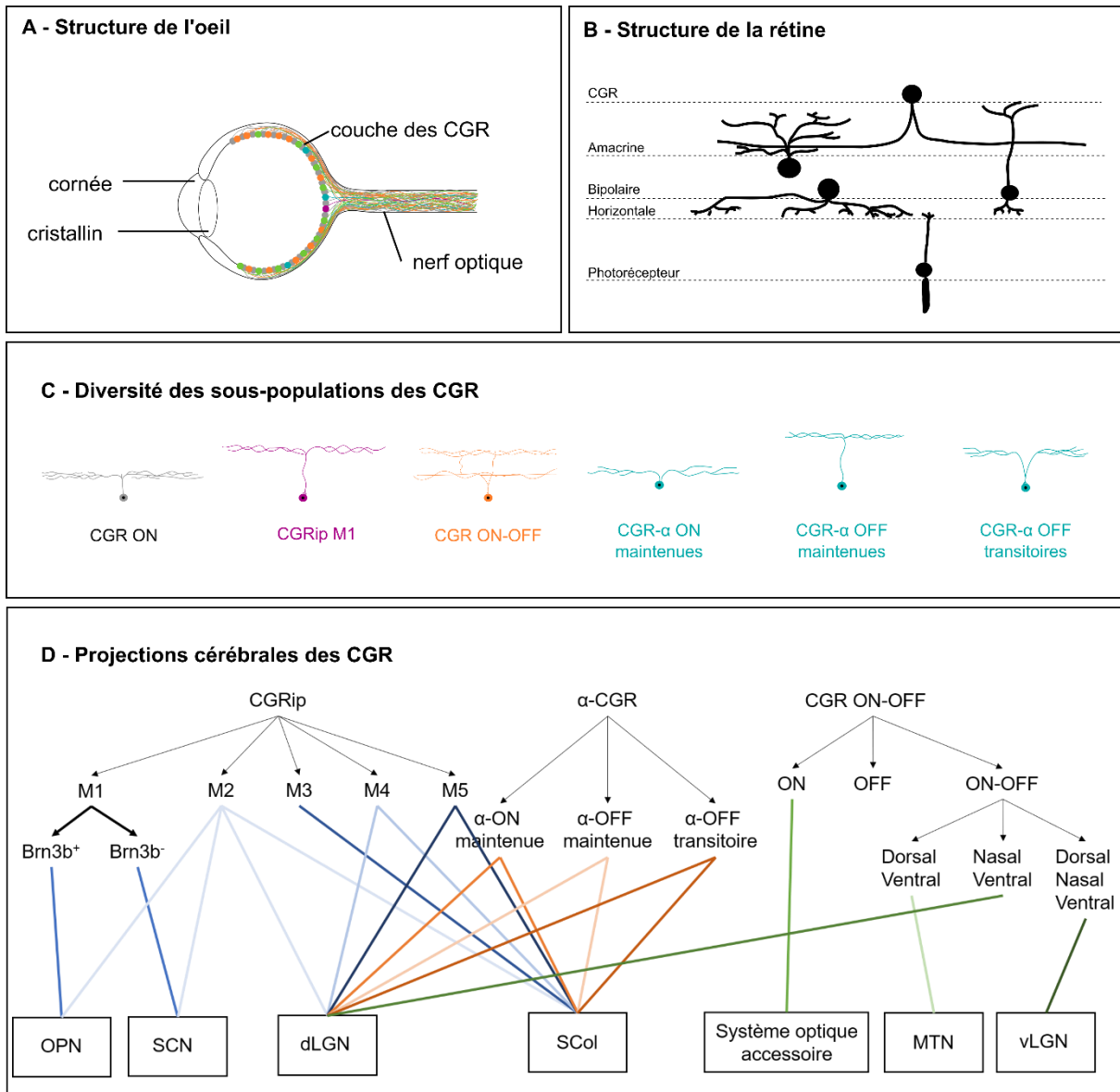


Figure 2 : Structure de l'œil et de la rétine

(A) Schéma représentatif de la structure de l'œil. La rétine se trouve au fond de l'œil, elle est constituée de nombreuses cellules dont les cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) qui sont les seuls neurones à projeter leur axone jusqu'au cerveau via le nerf optique. (B) Schéma de la structure de la rétine. La rétine est constituée de différentes couches cellulaires. La couche des photorécepteurs est la plus profonde, celle des CGR est la plus superficielle. (C) Représentation schématique de la diversité des sous-populations de CGR. Les CGR sont constituées d'environ 40 sous-populations différentes. Parmi elles on trouve les CGR sélectives de la direction ON et ON-OFF, les CGR intrinsèquement photosensibles (dont les CGRip M1), les CGR-α (qui comptent notamment : les CGR-α ON, les CGR-α OFF maintenues et les CGR-α OFF transitoires). **Adaptée de la perspective *Visual system repair : what's next ?* Vilallongue & Nawabi, 2022, Neural Regeneration Research.** (D) Projections cérébrales des différentes sous-populations de CGR. OPN Noyau Oligaire Prétectal, SCN Noyau Suprachiasmatic Nucleus, dLGN Corps Genouillé Latéral Dorsal, SCol Colliculus Supérieur, MTN Noyau Terminal Médial, vLGN Corps Genouillé Latéral Ventral.

Les photorécepteurs se divisent en deux catégories : les cônes et les bâtonnets. Les cônes sont responsables de la vision diurne (ou photopique) et des couleurs ; alors que les bâtonnets interviennent pour la vision nocturne (ou scotopique) puisqu'ils sont sensibles aux faibles luminosités. Dans la couche intermédiaire de la rétine, on trouve trois types neuronaux différents : les cellules horizontales, les cellules amacrines et les cellules bipolaires. Les cellules horizontales connectent les photorécepteurs aux cellules bipolaires par des prolongements parallèles à la rétine, situés dans la couche plexiforme externe. Les cellules bipolaires connectent les photorécepteurs aux CGR. Les cellules amacrines sont des interneurons situés dans la couche plexiforme interne qui connectent les cellules bipolaires aux cellules ganglionnaires de la rétine (CGR). Certaines cellules amacrines sont également trouvées dans la couche des CGR : ce sont les cellules amacrines déplacées.

Les cellules ganglionnaires de la rétine (ou CGR)

Les CGR ont leur corps cellulaire situé dans la couche la plus externe de la rétine. Ce sont les seuls neurones qui envoient leur axone via le nerf optique jusqu'au cerveau. Leurs prolongements passent par la couche plexiforme interne et se rejoignent au niveau du disque optique, au centre de la rétine, où ils forment le nerf optique. On compte environ 30 à 40 sous-populations de CGR (Sanes et Masland 2015) dans la rétine en fonction de leur code moléculaire, la taille et forme de leur arborisation dendritique, la taille de leur corps cellulaire ou encore de leur fonction (Figure 2-C). Il existe des marqueurs spécifiques à tous les CGR (pan-RGC markers) tels que RBPMS (RNA-binding protein with multiple splicing) (Rodriguez, de Sevilla Müller, et Brecha 2014) et la glycoprotéine Thy1 (Barnstable 1984). Les CGR peuvent être classés selon leurs fonctions : certaines sont impliquées dans les fonctions de formation de l'image (« image-formation functions » : intensité lumineuse, vitesse de déplacement, direction) et d'autres dans des fonctions non impliquées dans la formation de l'image (« non-image forming functions ») (Vilallongue et Nawabi 2022). Aujourd'hui, nous savons quelles sous-populations de CGR innervent quelles cibles du système visuel (Figure 2-D). Cependant, les molécules impliquées dans l'innervation de ces différentes cibles restent encore très peu connues (Seabrook et al. 2017). Ci-dessous, je vais décrire certaines sous-populations de CGR qui ont été largement caractérisées aussi bien au niveau moléculaire que phénotypique et fonctionnel.

A.1- Les cellules ganglionnaires sélectives de la direction ON-OFF

Parmi les CGR de la rétine, on trouve les CGR sélectives de la direction ON-OFF (ON-OFF directionally selective ganglion cells – ON-OFF DSGC, notées ici CGR ON-OFF) (Figure 2-C). Les CGR ON répondent à une augmentation de l'intensité lumineuse quand les CGR OFF répondent à une diminution de cette intensité. Autrement dit, les CGR ON répondent à

l'exposition d'objets lumineux et les CGR OFF à celle d'objets sombres. De plus, elles répondent d'autant plus aux petits stimuli visuels en mouvement (plutôt qu'à des stimuli stationnaires), peu importe leur vitesse de déplacement : chaque CGR ON-OFF s'active quand un stimulus bouge dans une direction précise qui sera la « direction préférée » de la cellule (Barlow 1965). Ainsi, les CGR ON-OFF sont divisées en 4 catégories : CGR ON-OFF dorsales, ventrales, temporales ou nasales (Oyster et Barlow 1967). Les CGR ON-OFF représentent une sous-population de CGR à part entière puisqu'elles expriment spécifiquement le marqueur CART (cocaine-and amphetamine regulated transcript) qui les différencie des autres CGR (Kay et al. 2011). De plus, les différentes sous-populations de CGR ON-OFF expriment spécifiquement des marqueurs tels que la cadhérine 6 (Cdh6), le collagène XXV α 1 ou la métalloprotéase 17. Les dendrites des CGR ON-OFF se présentent sous forme bistratifiée dans la couche plexiforme interne. Les CGR ON-OFF projettent à différents endroits dans le cerveau selon leur « direction préférée ». Par exemple, le corps genouillé latéral dorsal (dLGN) est innervé par les CGR ON-OFF ventrales et nasales (Rivlin-Etzion et al. 2011) ; alors que le noyau terminal médial (MTN) est connecté par les CGR ON-OFF dorsales et ventrales (exprimant la cadhérine 6 – Cdh6) (Kay et al. 2011) (Figure 2-D).

A.2- Les cellules ganglionnaires de la rétine sélectives de la direction ON

Il existe un autre groupe de CGR sélectives de la direction mais qui, contrairement aux CGR ON-OFF, ne répond qu'aux stimuli ON, ce sont les CGR ON (Barlow, Hill, et Levick 1964; Sun et al. 2006) (Figure 2-C). Ces cellules ne répondent qu'aux flashes lumineux en mouvement, plus particulièrement aux objets lumineux se déplaçant à faible vitesse. Elles sont divisées en 3 types puisqu'elles ont une « direction préférée » parmi 3 directions : vers le haut, vers le bas et de temporal vers nasal (Oyster 1968). Les CGR ON ont pu être marquées spécifiquement dans des souris transgéniques exprimant la GFP sous le promoteur Hoxd10 (Homeobox d10) (Dhande et al. 2013). Les CGR ON présentent des dendrites monostratifiées dans la couche plexiforme interne (Sanes et Masland 2015). Elles innervent le système optique accessoire composé du noyau terminal dorsal, du noyau terminal latéral et du noyau terminal médian (Figure 2-D). Ce système est impliqué dans le réflexe optocinétique qui permet d'éviter le glissement de l'image lors des mouvements de la tête (accompagnant les déplacements de l'individu) ou des mouvements perçus dans le champ visuel et donc la stabilisation de l'image (Yonehara et al. 2009).

A.3- Les cellules ganglionnaires de la rétine alpha (α -CGR)

Les α -CGR sont les plus grosses cellules de la rétine qui sont positives à SMI-32 (une forme non-phosphorylée des protéines des neurofilaments). Ces cellules sont donc riches en neurofilaments (Straznicky et al. 1992). Elles expriment également de hauts niveaux de la phosphoprotéine ostéopontine *spp1* et d'une sous-unité d'un canal calcique voltage-

dépendant *kcng4* (Duan et al. 2015). Chez la souris, trois types de α -CGR ont été identifiés selon leur réponse à la stimulation et leur morphologie (Figure 2-C). Les CGR- α ON maintenues (« sustained ON- α RGC ») maintiennent leurs courants (chlorures et cationiques) après une exposition à la lumière et possèdent des dendrites qui stratifient jusqu'à 70% de la profondeur de la couche plexiforme interne. Les CGR- α OFF maintenues (« sustained OFF- α RGC ») maintiennent leur activité dans l'obscurité et leurs dendrites recouvrent 50% de la profondeur de la couche plexiforme interne. Enfin, les CGR- α OFF transitoires (« transient OFF- α RGC ») présentent une activité transitoire en réponse à une exposition lumineuse et leurs dendrites atteignent seulement 30% de la profondeur de la couche plexiforme interne (Pang, Gao, et Wu 2003). Les CGR- α OFF transitoires et maintenues sont spécifiquement marquées chez la lignée de souris transgéniques TYW7 : la protéine YFP, la β -galactosidase et l'agglutinine de germe de blé sont exprimées sous le promoteur Thy1 (Kim et al. 2010). Grâce à la lignée murine CB2-EGFP (« calretinin-EGFP mice »), on peut distinguer spécifiquement les CGR- α OFF transitoires (Huberman et al. 2008). Enfin, les CGR- α ON sont les seules à exprimer faiblement la protéine mélanopsine, ce qui permet de les distinguer des deux autres sous-populations de α -CGR (Estevez et al. 2012).

A.4- Les cellules ganglionnaires de la rétine intrinsèquement photosensibles (CGRip ou ipRGC)

Les cônes et les bâtonnets ne sont pas les seules cellules photoréceptrices de la rétine. En effet, les CGR intrinsèquement photosensibles (ou CGRip) expriment spécifiquement la mélanopsine, un photo-pigment qui leur confère leur sensibilité propre à la lumière (Berson, Dunn, et Takao 2002). Les CGRip sont responsables de l'innervation de cibles cérébrales impliquées dans les fonctions autres que la formation de l'image (« non-image forming functions ») telles que le noyau suprachiasmatique (NSC ou SCN – suprachiasmatic nucleus) permettant le photo-entraînement des rythmes circadiens ou le noyau prétectal olivaire (NPO ou OPN – olivary pretectal nucleus) contrôlant le réflexe pupillaire dû à la lumière (Hattar et al. 2002) (Figure 2-D). Grâce à une souris transgénique exprimant la protéine fusionnée tau- β -galactosidase sous le promoteur *Opn4*, spécifique de la mélanopsine (souris *OPN4^{tau-LacZ}*), les cellules mélanopsine-positives, c'est-à-dire les CGRip, ont pu être marquées spécifiquement. On estime leur nombre à environ 1% des CGR totales de la rétine chez la souris. L'observation de X-gal dans les neurites de CGRip a révélé que leurs dendrites projetaient dans la sublamina externe de la couche plexiforme interne (ou « inner plexiform layer » - IPL) (Hattar et al. 2002) (Figure 2-C). Il existe différentes sous-populations de CGRip qui possèdent des morphologies et des fonctions différentes (Schmidt, Chen, et Hattar 2011). En effet, en utilisant un anticorps anti-mélanopsine, il a été observé que les dendrites des CGRip n'allaient pas toutes dans la couche externe de la sublamina de la IPL, mais aussi dans la couche interne de cette sublamina (Provencio, Rollag, et Castrucci 2002). Par le biais de ces différences

morphologiques, 5 sous-populations de CGRip ont été définies, elles sont nommées M1 à M5 (M1 correspondant aux CGRip classiques et M4 correspondant aux CGR- α ON décrites précédemment) (Berson, Castrucci, et Provencio 2010).

Les CGRip M1 envoient leurs neurites dans la partie la plus externe de la sublamina de la IPL (Berson, Castrucci, et Provencio 2010). Les cellules M1 représentent 80% des CGRip qui innervent le noyau suprachiasmatique, permettant la régulation des cycles circadiens (Baver et al. 2008). Toutes les CGRip expriment le photopigment mélanopsine mais ce sont les cellules M1 qui l'expriment le plus fortement (Ecker et al. 2010). De plus, les CGRip M1 peuvent être divisées en deux sous-populations selon leur expression ou non du facteur de transcription Brn3b (également appelé Pou4f). Ce sont en fait les cellules M1 Brn3b négatives qui innervent le noyau suprachiasmatique (Chen, Badea, et Hattar 2011). Grâce aux souris $Opn4^{\text{tau-LacZ}}$, on a observé que les cellules M1 projetaient également dans la partie périphérique (shell) du noyau OPN afin d'assurer le réflexe pupillaire dû à la lumière (Hattar et al. 2006). Plus particulièrement, ce sont les cellules M1 Brn3b positives qui connectent le noyau OPN (Chen, Badea, et Hattar 2011). Les cellules M1 innervent également d'autres structures impliquées dans la régulation des rythmes circadiens telles que le corps genouillé latéral ventral (vLGN) et le feuillet inter genouillé (« intergeniculate leaflet » ou IGL) (Hattar et al. 2006).

Les CGRip M2 envoient leurs neurites dans la partie la plus profonde de la sublamina de la IPL. Les cellules M2 ont des corps cellulaires plus gros, ainsi qu'une arborisation dendritique plus dense que les cellules M1 (Berson, Castrucci, et Provencio 2010). Les cellules M2 représentent les 20% restants des CGRip qui innervent le noyau suprachiasmatique (Baver et al. 2008).

Les CGRip M3 envoient leurs neurites dans les deux sublamina (profonde et externe) de la IPL (Berson, Castrucci, et Provencio 2010). Cette sous-population a été peu étudiée. Cependant, il semble que les cellules M3 projettent leurs neurites dans le colliculus supérieur (SCol) (Aranda et Schmidt 2021; Zhao et al. 2014).

Les CGRip M4 projettent dans la partie interne de la sublamina de la IPL, elles possèdent les corps cellulaires les plus gros et l'arborisation dendritique la plus complexe des CGRip (Ecker et al. 2010). Les cellules M4 projettent dans des régions impliquées dans la formation de la vision (« image-forming vision ») telles que le corps genouillé latéral dorsal (dLGN) et le colliculus supérieur (SCol) (Aranda et Schmidt 2021).

Les CGRip M5 projettent également dans la partie interne de la sublamina de la IPL mais elles ont une arborisation dendritique plus petite mais très branchée (Ecker et al. 2010). Ces cellules participent à la formation des images en innervant le dLGN (Aranda et Schmidt 2021).

Les cellules M2, M4 et M5 n'expriment pas de marqueurs spécifiques, ce qui ne permet pas de les distinguer : on peut donc dire que les cellules M2, M4 et M5 regroupées innervent également le corps genouillé latéral (LGN), le cœur du noyau OPN ainsi que le colliculus supérieur (SCol) (Baver et al. 2008; Schmidt, Chen, et Hattar 2011; Brown et al. 2010).

A.5 – Hétérogénéité des CGR dans la réponse à la lésion et la régénération

Chaque sous-population neuronale possède sa propre réponse à la lésion. En effet, selon l'identité de la CGR, son taux de survie est différent. Les CGR- α sont par exemple très résilientes à la lésion puisque 80% d'entre elles y survivent. Parmi les cellules qui survivent bien à la lésion, on trouve également les CGRip M1 (70% d'entre elles survivent) (Duan et al. 2015).

De plus, les sous-populations de CGR possèdent des capacités de régénération différentes. Les CGRip, par exemple, possède un bon taux de survie mais également une bonne capacité de régénération (Bray et al. 2019). Elles répondent différemment à la modulation des voies moléculaires permettant la régénération (Duan et al. 2015; Tran et al. 2019). Cette réponse peut être très différente selon la cellule concernée : par exemple, la modulation de Sox11 promeut la régénération des CGR non- α alors qu'elle tue les CGR- α (Norsworthy et al. 2017).

Il semblerait donc que différents cocktails de voies de signalisation soient nécessaires pour faire régénérer l'ensemble des neurones dans le but d'obtenir un circuit fonctionnel.

B - Les cibles cérébrales du système visuel

Les CGR sont les seuls neurones de la rétine à envoyer leur axone jusqu'au cerveau via les nerfs optiques. Les axones quittent chaque rétine par le disque optique (situé au centre de la rétine), poussent dans les nerfs optiques et se rencontrent au niveau du chiasma optique situé à la base de l'hypothalamus. Chez la souris, les axones des CGR situées dans les parties ventro-temporales des rétines ne traversent pas le chiasma et projettent dans les cibles visuelles ipsilatérales. Les axones des CGR localisées dans les autres parties de la rétine murine traversent la ligne médiane au niveau du chiasma optique pour projeter dans les cibles cérébrales controlatérales. La proportion des projections ipsi/contra détermine le degré de vision binoculaire. Chez la souris, seulement 5% des CGR projettent ipsilatéralement. Ce nombre est proche de 50% chez l'homme. Après avoir passé le chiasma optique, les axones continuent leur chemin via les tractus optiques avant d'atteindre les différentes cibles du système visuel (Erskine et al. 2014). De plus, les projections provenant de l'œil ipsilatéral et controlatéral ne se chevauchent pas dans les différentes zones cibles (à l'exception du NSC qui est innervé de façon égale par les deux yeux). Enfin, il existe des cartes rétinitopiques

dans les différentes cibles des CGR : c'est-à-dire que l'organisation des CGR au sein de la rétine est retrouvée dans les différentes régions qu'elles innervent dans le cerveau.

B.1- Le noyau suprachiasmatique (NSC, « suprachiasmatic nucleus » or SCN)

Le noyau suprachiasmatique (NSC) est constitué de deux parties situées de part et d'autre du troisième ventricule. Il est localisé dans la partie ventrale de l'hypothalamus, juste au-dessus du chiasma optique. Il est constitué d'environ 10 000 cellules chez la souris (Moore 2013) (Figure 3).

B.1.1- Les rythmes circadiens

Le NSC est décrit comme étant le régulateur des rythmes circadiens. En effet, la majorité des cellules du corps possède une horloge circadienne interne qui repose sur des boucles de rétrocontrôle transcriptionnelles positives et négatives permettant l'expression de protéines spécifiques, responsables des rythmes circadiens : le NSC est responsable de la synchronisation de toutes ces horloges. Le NSC est ainsi impliqué dans plusieurs phénomènes physiologiques tels que la régulation de la température corporelle, du sommeil ou de la production d'hormones.

C'est l'expression de différents transcrits de manière oscillatoire qui permet la mise en place des rythmes jour/nuit (Gekakis et al. 1998). L'exposition à la lumière va activer les CGRip exprimant le photo-pigment mélanopsine, ce qui va induire une libération des neurotransmetteurs glutamate et PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating peptide) dans les neurones du NSC (photo-entraînement). Une cascade de signalisation interne va ensuite permettre l'expression de différents facteurs de transcription, notamment Clock et Bmal1. Ces derniers sont des facteurs de transcription qui activent la transcription de 3 gènes de période (« period genes ») Per1 à Per3, et de 2 gènes cryptochromes Cry1 et Cry2. Les protéines PER et CRY sont ensuite transloquées dans le noyau et interagissent avec Clock et Bmal1 pour inhiber la transcription, réalisant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif (Vitaterna et al. 1999; Kume et al. 1999). Cette oscillation d'expression entre Clock- Bmal1 et Per-Cry se fait sur une période d'environ 24 heures, équivalent au cycle des rythmes circadiens.

De plus, le NSC est composé de différentes sous-populations neuronales qui expriment des neuropeptides différents : VIP (vasointestinal peptide) et GRP (gastrin-releasing peptide) dans le cœur du NSC (« core ») et AVP (arginine vasopressine peptide) dans la périphérie du NSC (« shell ») (Van Den Pol et Tsujimoto 1985) (Figure 4-A). Ces neuropeptides jouent également un rôle dans la régulation des rythmes circadiens. En effet, 10% des neurones du NSC expriment VIP, identifié comme un synchroniseur des circuits neuronaux : le relargage en rythme de VIP est important pour la synchronisation des rythmes circadiens (un excès (An et al. 2013) ou un manque de VIP (Colwell et al. 2003) dans les neurones du NSC

désynchronisent les rythmes). Concernant AVP, 20% des neurones du NSC expriment ce neuropeptide (Abrahamson et Moore 2001). Le promoteur du gène Avp contient une séquence cible des facteurs de transcription Clock-Bmal1 induisant une production rythmée de l'ARNm d'AVP (Uhl et Reppert 1985). La suppression d'AVP induit une perte des rythmes circadiens, montrant l'importance du neuropeptide dans cette régulation rythmique (Mieda et al. 2015).

B.1.2- Les afférences du noyau suprachiasmatique

Le NSC possède plusieurs afférences et plusieurs efférences (Figure 4-A). En effet, sa partie cœur (« core ») est innervée par les entrées visuelles provenant de la rétine, de l'IGL et de la zone prétectale. Il est innervé par les axones des CGRip via le tractus rétino-hypothalamique (RHT « retinohypothalamic tract ») (Moore, Speh, et Card 1995) qui permettent l'entraînement des rythmes circadiens par la lumière reçue. Le RHT est formé des axones collatéraux provenant des tractus optiques, il innerve également le feuillet inter genouillé (IGL) (Pickard 1985). Le NSC est d'ailleurs également innervé par l'IGL via le tractus géniculohypothalamique : il lui transmet des informations indépendantes de la lumière telles que des détails sur les conditions métaboliques (Saderi et al. 2013). De manière intéressante, le NSC reçoit autant de projections ipsilatérales que controlatérales depuis les yeux. En effet, les CGRip peuvent former des collatérales, c'est-à-dire qu'un CGRip innerve les deux parties du NSC (Fernandez et al. 2016).

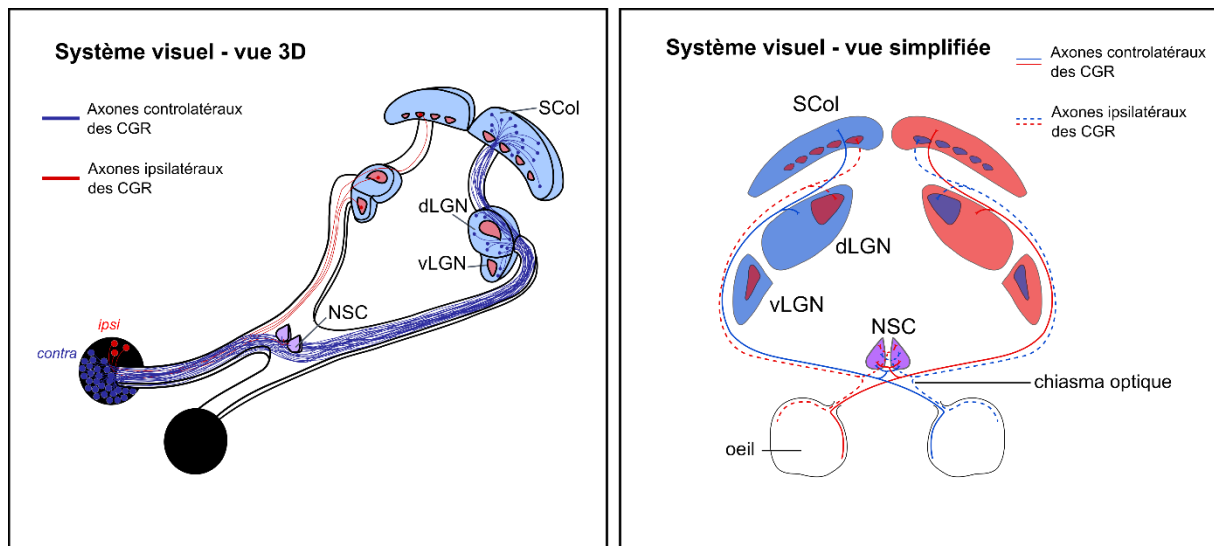


Figure 3 : Le système visuel

Le système visuel est constitué des yeux, des nerfs, du chiasma, des tractus optiques et des différentes cibles cérébrales connectées par les CGR : le noyau supra-chiasmaticus (NSC), le corps genouillé latéral dorsal (dLGN), le corps genouillé latéral ventral (vLGN) et le colliculus supérieur (SCol). Les axones contralatéraux des CGR croisent au niveau du chiasma optique pour innervent les cibles de l'autre côté dans le cerveau alors que les axones ipsilatéraux ne traversent pas la ligne médiane et innervent les régions cérébrales situées du même côté. **Adaptée des perspectives *Axon guidance in regeneration of the mature central nervous system: step by step*, Schaeffer, Vilallongue & Nawabi, 2023, Neural Regeneration Research et *Visual system repair: what's next?* Vilallongue & Nawabi, 2022, Neural Regeneration Research**

B.1.3- Les efférences du noyau supra-chiasmaticus

Les neurones du NSC envoient ensuite leurs prolongements à différentes régions cérébrales telles que : d'autres parties de l'hypothalamus, la zone pré-optique, la zone subparaventriculaire, la zone rétro-chiasmaticus, entre autres (Moore 2013). En plus des neuropeptides décrits précédemment, tous les neurones du NSC expriment également PKC2 (« prokineticin 2 ») qui est retrouvée dans les différentes régions connectées (Zhang, Truong, et Zhou 2009). Les rôles des différentes efférences du NSC ne sont pas tous connus mais certaines permettent une régulation du rythme locomoteur des animaux (Silver et LeSauter 1993).

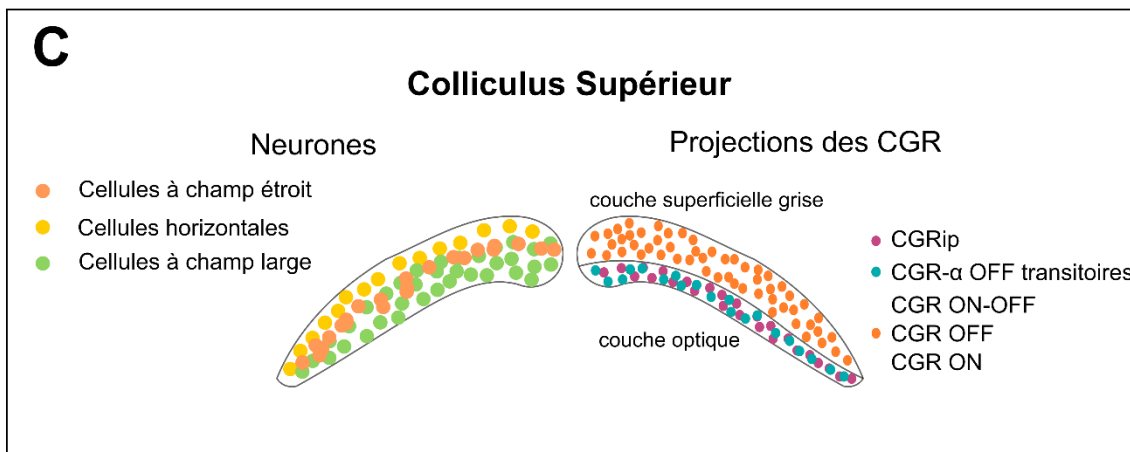
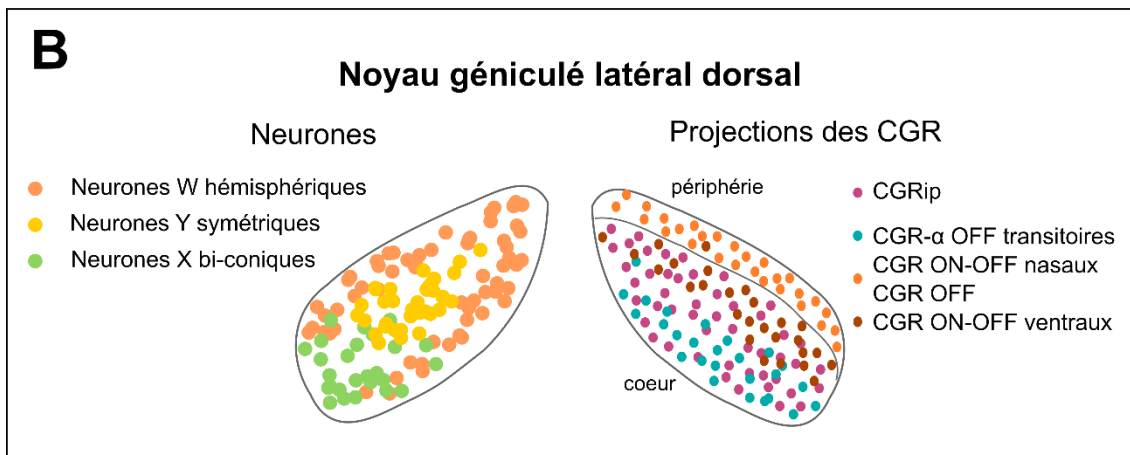
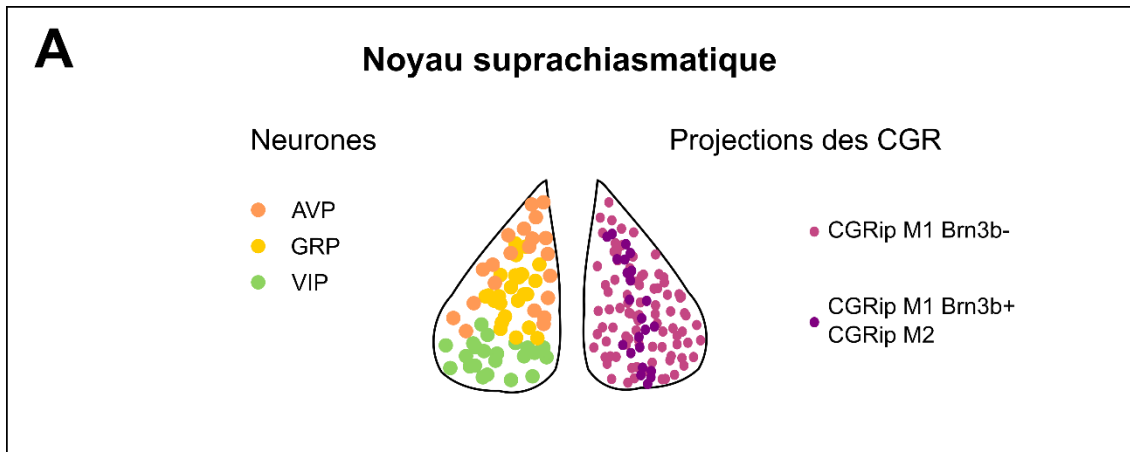


Figure 4 : Structure et afférences des cibles cérébrales des cellules ganglionnaires de la rétine

(A) Schéma de la composition neuronale du noyau suprachiasmatique (NSC) et de la localisation de ses afférences rétiniennes. (B) Schéma de la composition neuronale du corps genouillé latéral dorsal (dLGN) et de la localisation de ses afférences rétiniennes. (C) Schéma de la composition neuronale du colliculus supérieur (SCol) et de la localisation de ses afférences rétiniennes. *AVP*, arginine vasopressine peptide ; *GRP* gastrin-releasing peptide ; *VIP*, vasointestinal peptide ; *CGR*, cellules ganglionnaires de la rétine

B.2- Le corps genouillé latéral dorsal (dLGN)

Le corps genouillé latéral dorsal (dLGN) constitue le principal relais de l'information visuelle depuis la rétine jusqu'au cortex visuel. Il est situé dans le thalamus. Il possède, tout comme le NSC, deux parties symétriques situées de part et d'autre de la ligne médiane. Les CGR projettent leur axone dans le dLGN où ils font un relais pour rejoindre le cortex visuel. Le dLGN est majoritairement constitué de neurones thalamo-corticaux qui sont des cellules relais (90%) (**Figure 4-B**). Parmi elles, on trouve les cellules X (bi-coniques), les cellules Y (symétriques) et les cellules W (hémisphériques) qui sont disposées de manière précise dans le dLGN. Les cellules X se trouvent dans la partie ventrale du dLGN, les cellules Y dans le cœur du dLGN et les cellules W dans la périphérie du dLGN ([Krahe et al. 2011](#)). Ces neurones relais connectent le dLGN au cortex visuel. Le dLGN possède également 10% d'interneurones qui ne projettent pas dans le cortex mais dont la fonction est de moduler les neurones thalamiques au sein même du dLGN.

Les axones des CGR sont disposés d'une façon spécifique dans le dLGN : les axones provenant de l'œil ipsilatéral ne chevauchent pas ceux provenant de l'œil controlatéral dans le dLGN ([Jaubert-Miazza et al. 2005](#)) (**Figure 3**). Au cours du développement, les CGR envoient leur axone dans tout le dLGN (provenant de l'œil ipsilatéral et contralatéral), il y a ensuite un raffinement supprimant les chevauchements. Chez l'adulte, les projections de l'œil ipsilatéral sont moindres et sont rassemblées dans le cœur du dLGN, alors que les projections de l'œil controlatéral les entourent en périphérie. Cette ségrégation fait intervenir un gradient de molécules de guidage : les éphrines et leurs récepteurs Eph ([Huberman et al. 2005](#)). En effet, la surexpression d'EphA4 par électroporation dans les CGR de furet induit des défauts de ségrégation des projections dans le dLGN de la part des axones provenant des deux yeux.

De nombreuses sous-populations de CGR projettent dans le dLGN ([Kerschensteiner et Guido 2017](#)) (**Figure 4-B**). Par exemple, les CGR- α OFF transitoires innervent le dLGN, et ce d'une manière bien particulière. En effet, les axones de ces CGR forment des synapses avec les neurones du dLGN d'une façon laminaire, en couches précises ([Huberman et al. 2008](#)). De plus, les CGR ON-OFF projettent dans la périphérie ventrale du dLGN (nommée « shell ») ([Rivlin-Etzion et al. 2011](#)). On trouve également dans le dLGN des afférences des CGRip qui lui apportent des informations sur la luminosité ([Ecker et al. 2010](#); [Brown et al. 2010](#)).

B.3- Le colliculus supérieur (SCol)

Le colliculus supérieur (« superior colliculus » ou SCol) est la cible la plus postérieure des CGR. Comme les autres cibles des CGR, il est composé de deux parties positionnées symétriquement autour de la ligne médiane au niveau du mésencéphale. Il reçoit des afférences de différentes régions qui lui permettent de contrôler la coordination entre les yeux ainsi que les mouvements de la tête ([Sparks, Rohrer 1990](#)), notamment les mouvements vers

un objet d'intérêt. Le SCol a une structure laminée en plusieurs couches (Ito et Feldheim 2018). 85 à 90% des CGR projettent dans le SCol chez la souris et se connectent au niveau de la couche la plus superficielle du SCol, appelé SCol superficiel (sSC) (Dhande et Huberman 2014; Ellis et al. 2016). Les CGR ON-OFF projettent dans la partie dorsale du sSC, dans la couche la plus externe nommée uSCG (« upper stratum griseum superficial ») (Kay et al. 2011; Huberman et al. 2009). Les CGR- α OFF transitoires envoient leur axone dans la couche optique du SCol (« stratum opticum ») qui est la plus profonde (Huberman et al. 2008). Cette couche optique du SCol est également innervée par les CGRip (Hattar et al. 2006). Le SCol reçoit également des afférences depuis le cortex (V1 : cortex visuel primaire et S1 : cortex somatosensoriel primaire) via le tractus cortico-tectal (Harvey et Worthington 1990) (Figure 4-C).

Au sein du SCol, on trouve différents types de neurones : les cellules horizontales qui se localisent dans la partie la plus externe, les cellules à champ large, les cellules étoilées et les cellules à champ étroit qui se trouvent dans la partie la plus superficielle du SCol. Les cellules horizontales projettent ensuite dans les corps genouillés latéraux dorsal (dLGN) et ventral (vLGN) mais aussi dans le noyau parabigéminale (PBg). Les cellules à champ étroit innervent des parties plus profondes du SCol ainsi que le Pbg. Les cellules étoilées projettent dans le Pbg et dans les LGN. Enfin, les cellules à champ large envoient leur axone dans le noyau postérieur latéral du thalamus (Gale et Murphy 2014; May 2006) (Figure 4-C). Les fonctions de ces circuits restent encore à déterminer.

La mise en place du système visuel a été très bien étudiée pendant le développement. On commence à comprendre quel type de CGR projette dans quelle région du cerveau et la fonction qui leur est associée. Les cartes topographiques ont été très décrites. Ces éléments sont essentiels lorsqu'il s'agira de reconstruire le système visuel après une lésion.

IV- Différence de capacités régénératives des systèmes nerveux central et périphérique

Grâce à ces différents modèles d'étude, le système nerveux central et le système nerveux périphérique ont pu être étudiés en détails. Les chercheurs se sont notamment focalisés sur la différence de capacités régénératives observée entre ces deux systèmes. Pour cela, ils ont étudié précisément la composition de ces systèmes, leur réaction suite à une lésion, leur environnement et leurs capacités intrinsèques.

A- Système nerveux périphérique

Les neurones du SNP sont capables de régénérer leur axone après une lésion grâce à différents facteurs (**Figure 1**). Tout d'abord, l'environnement du SNP est favorable à la régénération axonale. En effet, suite à une lésion du SNP, les axones coupés sont dégradés par le phénomène de dégénération Wallérienne. Les cellules de Schwann qui constituent la gaine de myéline de ces axones prolifèrent et acquièrent un rôle de phagocytes afin de digérer les débris d'axones (**Perry et Brown 1992**), elles sont aidées par des macrophages d'origine sanguine qui infiltrent le site de la lésion (**Stoll et al. 1989**). En plus de débarrasser l'environnement des débris d'axones et de myéline, les macrophages sécrètent des facteurs pro-régénératifs tels que des facteurs de croissance, des protéines de la matrice extracellulaire (MEC), des chémokines et des cytokines (**Chen, Piao, et Bonaldo 2015; Perry et al, 1987**). Enfin, les cellules de Schwann s'alignent pour former des tubes appelés « bandes de Büngner » qui vont former une matrice pour les axones en cours de repousse et sécréter des molécules de guidage, permettant la navigation des axones en cours de régénération (**Guido Stoll et Müller 2006**).

De plus, les neurones du SNP eux-mêmes possèdent des capacités intrinsèques leur permettant de faire pousser un axone. En effet, ces neurones activent un ensemble de gènes qui favorisent la régénération. Ces gènes sont regroupés sous le terme de « RAG » pour « regeneration-associated genes », qui induisent l'extension des neurites et la régénération. Parmi les RAG, on trouve le facteur de transcription ATF-3 (activating transcription factor 3) qui est induit dans les ganglions dorso-rachidiens (DRG) après une lésion de leur branche périphérique (**Seijffers, Allchorne, et Woolf 2006**). Sox11 (SRY-box containing gene 11) est un facteur de transcription hautement exprimé dans les neurones sensoriels au cours du développement mais également après une axotomie chez la souris adulte. Sox11 joue un rôle important dans la repousse axonale notamment en interagissant avec ATF-3 (**Jankowski et al. 2009**). Enfin, SPRRP1A (small proline-rich repeat protein 1A) est surexprimé après une lésion et contribue à la repousse axonale notamment en s'associant à la F-actin et en modulant le cytosquelette (**Bonilla, Tanabe, et Strittmatter 2002**).

B- Système nerveux central

1. *L'environnement du système nerveux central est inhibiteur de la régénération*

Contrairement aux neurones du SNP, ceux du SNC ne sont pas capables de régénérer après une lésion. Une des premières hypothèses émises pour expliquer cette absence de régénération dans le SNC était l'environnement des neurones, différent de celui des neurones du SNP et supposé non permissif à la repousse axonale. David et Aguayo ont été les pionniers dans la compréhension du rôle inhibiteur de l'environnement des neurones du SNC. En effet, après une transection de la moelle épinière (appartenant au SNC), ils ont greffé un segment

de nerf sciatique (SNP) entre le tronc cérébral et la moelle épinière de rat adulte et ont observé une pousse des axones des neurones du SNC au sein de ce greffon sur environ 30mm (David et Aguayo 1981). Ces résultats ont ainsi mis en évidence que les neurones du SNC sont capables de régénérer leur axone mais seulement dans un environnement permissif tel que celui du SNP. De plus, la manipulation inverse, c'est-à-dire une greffe de nerf optique dans le nerf sciatique, inhibe la régénération au sein du SNP. Ceci renforce d'autant plus le rôle inhibiteur de l'environnement. À la suite de cette étude, de nombreux chercheurs se sont focalisés sur les facteurs responsables de cette inhibition de régénération dans le SNC.

Tout d'abord, lors d'une lésion du SNC, la dégénération Wallérienne a également lieu. Cependant, les débris de myéline provenant des oligodendrocytes lésés secrètent de nombreuses molécules inhibitrices de la repousse axonale et ne sont pas « nettoyés » aussi efficacement que dans le SNP.

a- La myéline : un des principaux inhibiteurs de la régénération

Les inhibiteurs associés à la myéline - MAI

Les débris de myéline secrétés dans la matrice extracellulaire à la suite d'une lésion du SNC produisent des molécules inhibitrices appelées inhibiteurs associés à la myéline (ou MAI : myelin-associated inhibitors) (Figure 5). Cette grande famille de molécules comprend entre autres :

(i) Nogo

La famille des Nogo comprend 3 isoformes : Nogo-A, Nogo-B et Nogo-C. Nogo-A ou Réticulon 4 (inhibiteur de la croissance des neurites, neurite outgrowth inhibitor) est principalement exprimé dans le système nerveux mais aussi dans les testicules et le cœur par les oligodendrocytes (Huber et al. 2002). Nogo-B est exprimé dans les SNC et SNP ainsi que dans certains tissus périphériques. Nogo-C est principalement retrouvé dans les muscles squelettiques, le cerveau et le cœur (Huber et al. 2002). Nogo-A est la forme majoritaire dans le SNC. Il inhibe la croissance axonale ; son inactivation par le biais d'anticorps monoclonaux tels que IN-1 promeut la régénération axonale dans le SNC de rats adultes (Chen et al. 2000).

(ii) OMgp

Les OMgp (oligodendrocyte myelin glycoproteins) sont des glycoprotéines à ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) exprimées dans les gaines de myéline par les oligodendrocytes (Mikol and Stefansson 1988). Après une lésion du SNC, elles sont retrouvées dans les débris de myéline (Kottis et al. 2002). Elles semblent interagir avec Nogo induisant la collapse des cônes de croissance et l'inhibition de la repousse axonale (Wang et al. 2002).

(iii) MAG

Les MAG (glycoprotéines associées à la myéline ou myelin-associated glycoproteins) se retrouvent à la surface des oligodendrocytes ou sous une forme sécrétée. Ils appartiennent à

un sous-groupe de la superfamille des immunoglobulines (Ig) appelé Siglecs qui sont des protéines dépendantes de l'acide sialique (Kelm et al. 1994). Au cours du développement, les MAG promeuvent la croissance axonale des neurones embryonnaires et néonataux.

Cependant, dès l'âge de P3-P4, les MAG inhibent cette pousse axonale (DeBellard et al. 1996). Un fragment protéolytique soluble de MAG appelé dMAG a été identifié dans la myéline dégradée et inhibe la repousse axonale des neurones cultivés *in vitro*. dMAG a également été décrit comme la molécule inhibitrice majoritaire dans la matière blanche lésée et comme étant sécrétée *in vivo* à partir du site de lésion, affectant la régénération post-lésion (Tang et al. 2001; 1997).

b- La cicatrice gliale

En plus des facteurs inhibiteurs produits par les débris de myéline, le SNC présente une particularité empêchant la régénération axonale : la cicatrice gliale (Fawcett et Asher 1999) (Figure 5). Cette cicatrice est composée de deux parties : une première partie appelée cœur de la lésion (« lesion core ») composée des fibroblastes des méninges, de cellules endothéliales vasculaires et de cellules de l'inflammation ; et d'une deuxième partie, à la périphérie, composée principalement des astrocytes. Chronologiquement, lors d'une lésion du SNC, lorsque la barrière hémato-encéphalique est rompue, le premier événement est l'arrivée des cellules de l'inflammation depuis la circulation sanguine et l'activation de la microglie se trouvant proche du site de lésion. En effet, l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique permet le recrutement de protéines sanguines telles que la thrombine (Nishino et al. 1993) ou le fibrinogène (Ryu, Davalos, et Akassoglou 2009) qui vont enclencher la réaction inflammatoire. Ensuite, ce sont les oligodendrocytes précurseurs qui rentrent dans une phase de prolifération, suivis par l'activation des astrocytes (Keirstead, Levine, et Blakemore 1998). Enfin, les cellules des méninges, les fibroblastes et les cellules endothéliales envahissent le cœur de la lésion (Bradbury et Burnside 2019). Les différents types cellulaires intervenant lors de la formation de la cicatrice gliale ainsi que leurs rôles sont décrits dans les sections suivantes.

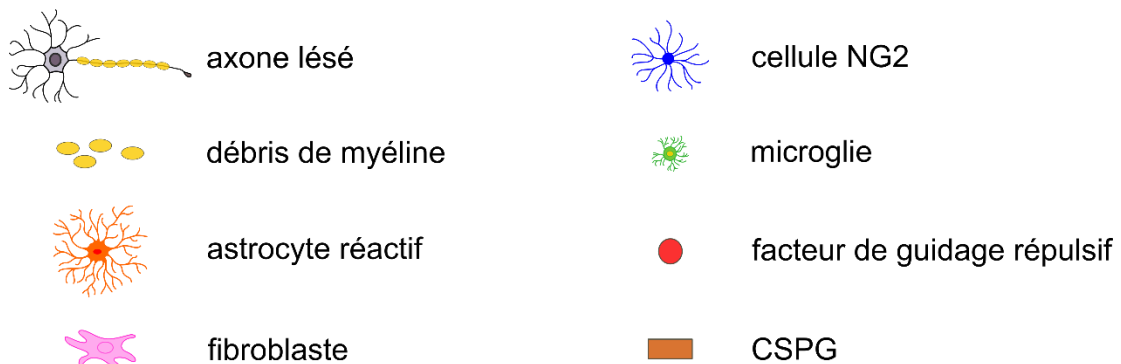
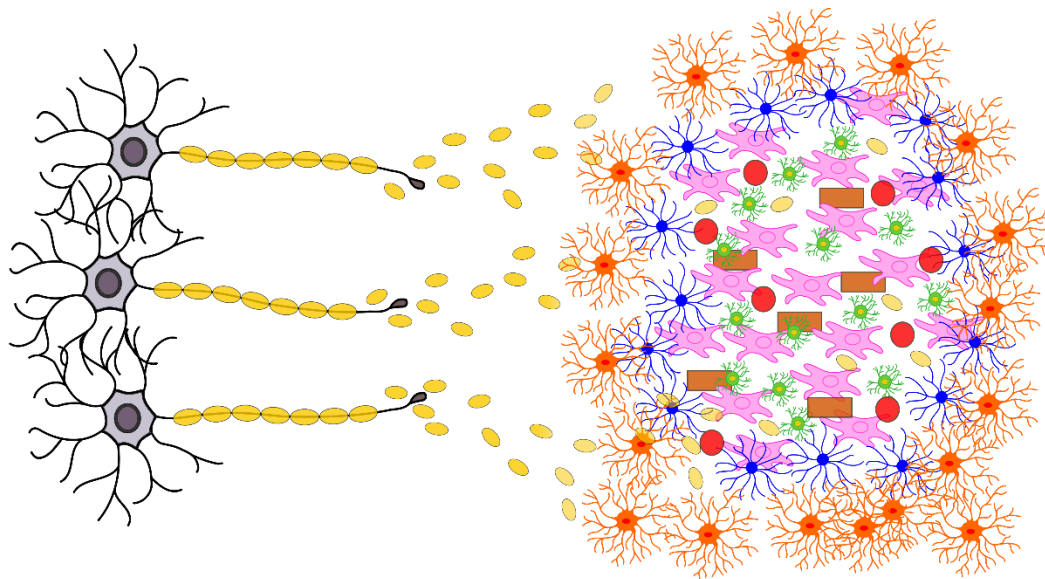


Figure 5 : La cicatrice gliale et les inhibiteurs dérivés de la myéline

Les axones lésés dégénèrent et libèrent des débris de myéline dans leur environnement. Les fibroblastes, la microglie, les débris de myéline, les cellules NG2, les CSPG, les facteurs de guidage répulsifs et les astrocytes réactifs créent un enchevêtrement formant la cicatrice gliale. Cette cicatrice constitue une barrière physique empêchant les axones de pousser plus loin mais aussi une barrière chimique à la régénération avec la sécrétion de nombreux facteurs répulsifs et inhibiteurs.

b.1 - La microglie

Dans le SNC en condition non pathologique, la microglie est dans un état quiescent. À la suite d'une lésion du SNC, ce sont les premières cellules à réagir : elles s'activent, se multiplient et migrent vers le site de la blessure (**Figure 5**). La microglie phagocyte les débris de tissus lésés ([Greenhalgh et David 2014](#)). Ensuite, les cellules de la microglie prennent une morphologie proche de celle des macrophages. De plus, lorsque des vaisseaux sanguins sont

endommagés par la blessure, des macrophages de la circulation sanguine s'infiltrent au niveau de la lésion pour participer à la formation de la cicatrice gliale. La quantité de microglie/macrophages restent élevée plusieurs semaines après la lésion.

Le rôle exact de la microglie en tant qu'inhibiteur de la repousse axonale ou au contraire, son effet bénéfique sur la régénération est controversé. D'une part, certaines études ont montré que l'activation de la microglie due à une lésion du SNC, induit des mécanismes inhibant la croissance axonale. C'est le cas de Bruce et ses collaborateurs, qui ont décrit une interaction entre le facteur TNF (tumor necrosis factor- α) et la microglie. A la suite d'une lésion du SNC, l'expression du facteur TNF augmente largement (Bruce et al. 1996). TNF induit la prolifération de macrophages et de microglie et peut également induire une réactivité de la microglie : elle va produire des facteurs cytotoxiques et des radicaux libres (ions superoxyde) (Merrill 1991). Dans une deuxième étude, plus récente, l'expression de molécules de guidage répulsives par la microglie lui confère aussi un rôle inhibiteur de la repousse axonale. En effet, la microglie exprime RGMa, une molécule de guidage répulsive (RGMa : repulsive guidance molecule A) empêchant la croissance des axones et induisant le collapse des cônes de croissance. L'administration de minocycline, un inhibiteur de l'activation de la microglie, induit une diminution de l'expression de RGMa ainsi qu'une réduction de la rétraction des axones du tractus cortico-spinal (CST) (Kitayama et al. 2011). D'autre part, il semble que le rôle de la microglie soit bénéfique à la réparation des tissus. En effet, à la suite d'une lésion, la microglie s'active et devient pro-inflammatoire (état M1). La microglie M1 produit des cytokines pro-inflammatoires et des radicaux libres (Edwards et al. 2006). Cette étape est suivie par une transition vers un état pro-régénératif (état M2) qui permet d'induire une remyélinisation (Lloyd et al. 2019). La microglie M2 sécrètent des cytokines anti-inflammatoires ainsi que des facteurs de croissance (Edwards et al. 2006). C'est la microglie M2 qui va favoriser la régénération axonale.

b.2 - Les oligodendrocytes survivants

Lors d'une lésion du SNC, les axones dégènèrent tout comme la myéline qui les entourait. Cette myéline est constituée par des oligodendrocytes qui correspondent aux cellules de Schwann du SNP. Le nettoyage de l'environnement après une lésion est entrepris par la microglie : ce processus peut prendre plusieurs semaines. Cependant, parmi les débris, on peut trouver des oligodendrocytes survivants. Ces derniers participent à la formation de la cicatrice gliale. De plus, des inhibiteurs de croissance des neurites sont exprimés à leur surface tels que NI-35 et NI-250 (neurite growth inhibitors) (Bandtlow et al. 1993). Enfin, les oligodendrocytes semblent être associés avec la Tenascin-R, une glycoprotéine de la matrice extracellulaire dont l'expression augmente après une lésion du SNC et qui confine les axones, empêchant leur régénération (Nörenberg, Hubert, et Rathjen 1996).

b.3 - Les cellules progénitrices d'oligodendrocytes

Les cellules progénitrices d'oligodendrocytes aussi appelées cellules précurseurs d'oligodendrocytes (OPCs – oligodendrocyte precursor cells) ou encore cellules immuno-réactives NG2 (exprimant la protéine neural/glial 2) forment une réserve de progéniteurs dans le SNC. Les OPC produisent un protéoglycane nommé NG2 : l'intensité de marquage de NG2 augmente dans les OPC après une lésion, révélant leur prolifération, puis, une accumulation est observée au niveau de la cicatrice gliale, reflet de leur migration. Les OPC se différencient ensuite en oligodendrocytes matures. L'expression du protéoglycane NG2 par les OPC prouvent leur rôle dans l'inhibition de la régénération au niveau de la cicatrice gliale (cf. « CSPG – protéoglycanes de sulfate de chondroïtine – inhibiteurs de la repousse axonale » plus bas).

b.4 - Les astrocytes

b.4.1- Les astrocytes : composants majoritaires de la cicatrice gliale

Lors d'une lésion du SNC, les astrocytes se trouvant en majorité dans la matière grise deviennent réactifs. Cette réaction astrocytaire se caractérise par une hypertrophie des astrocytes, une augmentation de leur prolifération ainsi que par la production de GFAP (protéine acide fibrillaire gliale – glial fibrillary acidic protein) (Bignami et Dahl 1974), mais aussi de vimentine et de nestine, toutes trois des protéines des filaments intermédiaires (Dahl 1981; Li et Chopp 1999). La GFAP constitue le principal marqueur de l'activation astrocytaire (Bignami et Dahl 1976). Les astrocytes réactifs se multiplient ensuite : l'enchevêtrement de leurs prolongements formant le principal composant de la cicatrice gliale (Figure 5).

b.4.2- Les astrocytes sécrètent des molécules inhibitrices à la régénération

Cette cicatrice constitue une barrière physique à la repousse axonale, mais également une barrière chimique. En effet, les astrocytes de la cicatrice sécrètent des molécules inhibitrices pour la repousse axonale.

b.4.2.1- CSPG – protéoglycanes de sulfate de chondroïtine – inhibiteurs de la repousse axonale
Parmi les molécules inhibitrices sécrétées par les astrocytes se trouvent les CSPGs (protéoglycanes de sulfate de chondroïtine ou chondroïtin sulphate proteoglycanes) (Morgenstern, Asher, et Fawcett 2002) qui sont des molécules de la matrice extracellulaire produits en grand nombre par les astrocytes réactifs de la cicatrice gliale suite à une lésion du SNC (Davies et al. 1997). Elles sont composées d'une protéine de cœur (core protein) liée à des chaînes de glucides GAGs (glycosaminoglycanes) ; elles peuvent être liées à la membrane des astrocytes ou sécrétées dans l'environnement. Il existe différents CSPGs qui sont tous surexprimés après une lésion du SNC (Jones, Margolis, et Tuszynski 2003). Parmi eux, on trouve la famille des hyalectans composée de neurocan, aggrecan, versican, brevican et NG2.

b.4.2.2- Autres facteurs sécrétés par les astrocytes

En plus des CSPG, les astrocytes sécrètent d'autres facteurs au niveau de la cicatrice gliale. On y trouve des facteurs de croissance tels que TGF- β 1 qui attirerait des fibroblastes au niveau du site de lésion. Ces derniers sont responsables de la production des protéines de la matrice extracellulaire ainsi que d'enzymes jouant un rôle dans la vascularisation de la cicatrice gliale (Logan et al. 1992). Les astrocytes produisent également des protéases tels que la calpaïne I (Siman, Card, et Davis 1990) ainsi que des inhibiteurs de protéases comme ACT (α -1-antichymotrypsine) (Pasternack et al. 1989) supposés aider les astrocytes à remodeler la matrice extracellulaire au niveau de la blessure mais aussi pour le nettoyage des débris de myéline.

b.4.3- Initiation de la réponse immunitaire par les astrocytes

Enfin, les astrocytes sont les déclencheurs de la réponse immunitaire à la suite d'une lésion du SNC. Ils sont capables d'exprimer à leur surface un complexe majeur d'histocompatibilité permettant de présenter des antigènes aux lymphocytes T et de les activer ensuite. Les astrocytes produisent également des cytokines qui jouent le rôle de signaux induisant des réponses cellulaires (Fontana, Fierz, et Wekerle 1984).

b.5 - Les fibroblastes

Quelques jours après la lésion, les fibroblastes envahissent le site de la blessure, prolifèrent et sécrètent des protéines de la matrice extracellulaire (Figure 5). Parmi elles, on trouve la fibronectine, le collagène IV et la laminine qui vont former la cicatrice fibreuse (Shearer et Fawcett 2001). La cicatrice fibreuse permet de colmater la blessure. Cependant, la présence de cet environnement fibreux empêche le passage des potentiels axones qui pourraient régénérés. De plus, les fibroblastes sécrètent des molécules inhibitrices à la régénération telles que NG2 et Tenascin-C (Tang, Davies, et Davies 2003). Néanmoins, la cicatrice gliale joue un rôle protecteur puisqu'elle permet de stabiliser les tissus du SNC fragilisés par la lésion. En effet, lorsque les astrocytes réactifs sont inhibés par une injection virale d'herpès, la cicatrice gliale ne se forme plus. On observe alors une infiltration des leucocytes, une absence de réparation de la barrière hémato-encéphalique et une dégénération neuronale supplémentaire (Bush et al. 1999; Faulkner et al. 2004).

c- Autres inhibiteurs à la régénération du système nerveux central

Mise à part les inhibiteurs de régénération trouvés dans les débris de myéline ou dans la cicatrice gliale, il existe des molécules de guidage qui se trouvent dans l'environnement des axones lésés qui empêchent également leur repousse (Figure 5).

Les molécules de guidage ont été largement décrites au cours du développement : attractives ou répulsives, elles permettent de guider les axones en cours de croissance tout au long de leur chemin pour leur permettre de connecter leurs cibles correctes dans le corps. Leur

structure et leur mode de fonctionnement seront détaillés plus exhaustivement dans le deuxième chapitre de l'introduction.

Cependant, certaines molécules de guidage ont été identifiées dans le système nerveux adulte. En effet, elles peuvent jouer des rôles dans l'excitabilité des neurones mais aussi la stabilisation synaptique (Klein 2009). Les fonctions des molécules de guidage chez l'adulte, en conditions physiologiques et pathologiques seront abordées dans le dernier chapitre de l'introduction.

De manière intéressante, après une lésion du SNC, plusieurs molécules de guidage connues pour être répulsives voient leur expression augmenter au niveau du site de la lésion. Parmi elles se trouvent les sémaphorines, les éphrines, les nétrines, Wnt, et les slits (Giger, Hollis, et Tuszynski 2010). L'augmentation de l'expression de molécules de guidage répulsives participerait à l'incapacité de régénération des neurones du SNC.

c.1 – Les sémaphorines

Les sémaphorines constituent une des classes canoniques de molécules de guidage répulsives au cours du développement. Après une lésion dans le SNC, les fibroblastes qui envahissent le cœur de la blessure (pour ensuite former la cicatrice gliale) expriment les sémaphorines qui sont sécrétées : Sema3A, Sema3B, Sema3C, Sema3E et Sema3F (Pasterkamp et al. 1999). Les neurones du SNC adulte continuent d'exprimer les récepteurs pour les sémaphorines (neuropilines et plexines) et il semblerait que leur réponse à ces molécules inhibitrices reste la répulsion, comme chez l'embryon. En effet, les axones des neurones sensoriels sont repoussés par les Sema3 *in vitro* et *in vivo* (Tanelian et al. 1997). De plus, la branche centrale des DRG pré-conditionnés ne régénère plus en présence de la cicatrice gliale exprimant des Sema3 (Reza, Gavazzi, et Cohen 1999). D'autres sémaphorines qui sont membranaires comme Sema4D sont également proposées pour être responsables de l'inhibition de la repousse des axones du SNC. En effet, Sema4D est exprimée par les oligodendrocytes et son expression augmente après la lésion de la moelle. Lors du développement, elle est responsable de l'inhibition de la croissance axonale des neurones du cervelet après la naissance (Moreau-Fauvarque et al. 2003). Enfin, l'expression de Sema6B augmente près du site de transection du fornix chez le rat adulte (Kury et al. 2004) et Sema7A est exprimée par les oligodendrocytes de la matière blanche de la moelle épinière (Pasterkamp et al. 2007). La présence de sémaphorines, molécules de guidage répulsives, au niveau de la cicatrice gliale et leur augmentation après la lésion sont autant d'indices suggérant leur rôle dans l'inhibition de la repousse axonale des neurones du SNC. En effet, la délétion de Sema5A et Sema6D (ou de leurs récepteurs Neuropilin1 et PlexinA1) inhibe la rétraction des axones ainsi que leur dépérissement (ou « dieback ») (Ueno et al. 2020).

c.2- Les éphrines

Les éphrines sont des molécules de guidage répulsives au cours du développement. Ce sont des protéines transmembranaires qui se lient à leurs récepteurs Eph, appartenant à la famille des tyrosine-kinases. Semblablement aux sémaphorines, l'expression des éphrines a été observée proche des sites de lésion. C'est le cas d'EphrinA5 dont l'expression augmente dans les tissus proches des lésions ischémiques du cortex ([Carmichael et al. 2005](#)). EphrinB3 est également exprimée par les oligodendrocytes et est responsable d'une inhibition de la repousse neuritique ([Benson et al. 2005](#)). Enfin, l'expression d'EphrinB2 augmente dans les astrocytes réactifs à la suite d'une lésion ([Bundesen et al. 2003](#)), tout comme EphA4 ([Goldshmit et al. 2004](#)) et contribuent ainsi à la formation de la cicatrice gliale. Les éphrines et leurs récepteurs jouent donc également un rôle inhibiteur pour la régénération axonale des neurones du SNC.

c.3- Les nétrines

Les nétrines sont des molécules de guidage bifonctionnelles : répulsives quand elles interagissent avec leur récepteur UNC5 et attractives lorsqu'elles se lient à leur récepteur DCC. Netrin1 est exprimée par les oligodendrocytes matures dans la moelle épinière adulte en conditions normales ainsi qu'après la lésion ([Manitt et al. 2001; 2006](#)). Les récepteurs UNC5 de Netrin1 sont également exprimés dans les projections descendantes de la moelle épinière ([Löv et al. 2008](#)). Enfin, Netrin1 est un inhibiteur de la croissance axonale *in vitro* et *in vivo* et constitue donc un inhibiteur potentiel de la régénération du SNC associé aux oligodendrocytes ([Löv et al. 2008](#)).

c.4- Les Wnt

La signalisation Wnt régule le guidage axonal au cours du développement. Les Wnt sont également bifonctionnels : ils attirent les axones somatosensoriels ascendants pour les faire naviguer de la moelle épinière au cerveau ; et ils repoussent les axones descendants du tractus corticospinal dans la direction opposée. L'attraction des axones ascendants se fait par le biais de l'interaction de Wnt-4 avec son récepteur Frizzled ; alors que la répulsion des axones descendants fait intervenir Wnt-5a et son récepteur tyrosine kinase Ryk ([Liu et al. 2005; Lyuksyutova et al. 2003](#)). Chez l'adulte, les Wnt ne sont plus exprimés ; mais certains sont activés de nouveau après une lésion de la moelle épinière, tels que Wnt1 et Wnt5a, tout comme leur récepteur Ryk, responsable de la répulsion induite par ces molécules. Pour toutes ces raisons, la signalisation Wnt pourrait expliquer en partie la rétraction des axones du tractus corticospinal et l'inhibition de la repousse axonale chez l'adulte ([Liu et al. 2008](#)).

c.5- Les Slits

La famille des molécules de guidage sécrétées Slits est connue pour être répulsive lorsqu'ils interagissent avec leur récepteur Robo, au cours du développement. Chez l'adulte, les molécules Slits sont exprimées au niveau du site de lésion notamment dans le cortex après

une cryo-lésion (Hagino et al. 2003). Slit2, le plus exprimé, est associé aux astrocytes réactifs : suggérant que Slit2 empêcherait les axones en cours de régénération de dépasser le site de la lésion (Hagino et al. 2003). De plus, Slit1 et Slit3 sont également surexprimés à la suite d'une lésion de la moelle épinière, notamment par les cellules situées au centre du site de lésion. Ceci suggère leur implication dans la formation de la cicatrice gliale ainsi que l'inhibition de la régénération axonale des neurones du SNC (Wehrle et al. 2005).

c.6- Autres molécules de guidage

En plus des molécules de guidage classiques, on trouve différentes protéines jouant un rôle inhibiteur pour la repousse des neurones du SNC. Parmi elles, on compte RGMA (décrit précédemment III-D-b.1), une molécule de guidage répulsive exprimée par la microglie. Après une lésion de la moelle épinière, l'expression de RGMA est augmentée dans les neurones, les oligodendrocytes, les macrophages et les astrocytes réactifs : l'environnement de la lésion devient répulsif et les neurones possèdent des propriétés inhibitrices de la régénération (Varadarajan et al. 2022).

Les CSPG (cf. III-D-b.4.2.1) sont des protéines de la matrice extracellulaire qui participent au guidage axonal au cours du développement. Chez l'adulte, l'expression des CSPG augmente à la suite d'une lésion du SNC (Mckeon, Höke, et Silver 1995). C'est une molécule inhibitrice qui empêche la croissance des neurites des neurones adultes (Snow et al. 1990). Leur dégradation par le chondroïtinase ABC montre une amélioration de la régénération qui peut s'accompagner d'amélioration fonctionnelle (Alilain et al. 2011).

d- La modulation de l'environnement du SNC ne suffit pas pour promouvoir la régénération

La plupart des données décrites ci-dessus, reposent sur des analyses histologiques de l'expression de ces facteurs et de leur modulation *in vitro* dans des cultures embryonnaires de neurones. Ces résultats suggèrent fortement que l'environnement du SNC est inhibiteur pour la repousse axonale. Ainsi une hypothèse a été émise pour permettre la régénération : se délester de cet environnement. Des chercheurs ont ainsi supprimé les inhibiteurs de myéline les plus abondants dans le SNC, c'est-à-dire Nogo et MAG, *in vivo*. Ainsi ils ont généré une lignée de souris qui n'exprime plus ces protéines. De façon surprenante, le phénotype de régénération de ces souris est identique aux souris contrôles. Les axones ne sont pas capables de traverser le site de la lésion. Ainsi, la levée de cette inhibition n'est pas suffisante pour permettre la régénération des axones après une lésion de la moelle épinière (Lee et al. 2010). De plus, des chercheurs ont mis en culture des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR, appartenant au SNC) purifiées à différents âges et ont observé leur croissance. Ils ont ainsi démontré que les CGR adultes régénéraient très peu, même en l'absence de l'environnement inhibiteur du SNC (Goldberg et al. 2002). Il apparaît donc que l'environnement

du SNC n'est pas le seul responsable de l'inhibition de la régénération axonale. C'est pourquoi, les chercheurs se sont ensuite focalisés sur les neurones eux-mêmes et les programmes génétiques intrinsèques qui pourraient expliquer cette incapacité à repousser après la lésion.

2. Les capacités intrinsèques des neurones du système nerveux central

Au cours du développement, les neurones ont d'importantes capacités de croissance, leur permettant de faire pousser leur axone sur de plus ou moins longues distances afin de connecter leur cible correcte dans le corps. Ainsi, on obtient un circuit nerveux branché de manière fonctionnelle. Cependant, il semblerait que les neurones du SNC, au cours de leur maturation, perdent leurs capacités de croissance axonale. Après la lésion, il se forme un bulbe de rétraction au bout de l'axone lésé : à ce niveau, des débris de membranes sont endocytés dans des vésicules qui sont transportées de manière rétrograde (sens contraire de la dynamique des membranes observée pendant la croissance axonale au cours du développement) (Tom et al. 2004). Ce bulbe de rétraction n'a pas la capacité de former un cône de croissance, à l'instar du SNP. Le cône de croissance est une structure située au bout de l'axone en cours de croissance qui lui permet de sentir son environnement et de répondre aux différentes molécules de guidage présentes (Figure 8). Cette incapacité à former un cône de croissance est considérée comme l'élément clé de l'inaptitude des axones du SNC à régénérer. De plus, certains programmes transcriptionnels actifs au cours du développement sont inhibés après la naissance. Pour toutes ces raisons, les neurones matures du SNC sont incapables de régénérer après une lésion.

a- La voie mTOR

Les études se sont donc focalisées sur ces programmes moléculaires actifs lors du développement et qui sont sous-régulés chez l'adulte. C'est le cas de la voie de signalisation cellulaire mTOR (mammalian target of rapamycin) régulant la croissance cellulaire, le métabolisme, la migration cellulaire, la survie cellulaire en modulant la synthèse protéique (Wei, Luo, et Chen 2019). L'activation de cette voie est sous-régulée chez l'adulte et encore plus après une lésion. mTOR est une sérine/thréonine kinase, membre de la famille des kinases associées à PI3K (PIKK), qui en s'associant à d'autres molécules, forment les complexes mTORC1 et mTORC2. D'une part, mTORC1 régule la production de protéines, de lipides et de nucléotides permettant la croissance et la division cellulaires. Il intervient principalement en phosphorylant les protéines S6 kinase 1 (S6K1) et eIF4E binding protein ce qui promeut la traduction d'ARNm et donc la synthèse protéique (Holz et al. 2005). En activant SREBP (sterol responsive element binding protein), mTORC1 permet la synthèse de novo des lipides nécessaires à la fabrication et à l'extension des membranes (Porstmann et al. 2008). En activant l'expression de protéines favorisant la synthèse de purines (Ben-Sahra et al. 2016) ou pyrimidines (Ben-Sahra et al. 2013), mTORC1 permet la synthèse des nucléotides

nécessaires à la réplication de l'ADN et à la formation des ribosomes. D'autre part, mTORC2 contrôle la survie et la prolifération cellulaires en phosphorylant des membres de la famille des AGC (PKA, PKG, PKC) qui régulent le cytosquelette d'actine et donc la migration cellulaire (Jacinto et al. 2004). mTORC2 est également responsable de la phosphorylation d'AKT, le principal effecteur de la signalisation insuline/PI3K qui promeut la croissance, la survie et la prolifération cellulaires (Sarbasov et al. 2005).

La phosphorylation de la protéine S6 (P-S6) est une résultante de l'activation de la voie mTOR. En se focalisant sur l'expression de P-S6 dans les CGR, Park et ses collaborateurs ont observé que l'expression intense de P-S6 dans les CGR embryonnaires était diminué de 90% dans les CGR adultes, suggérant une diminution de l'activation de la voie mTOR chez l'adulte (Park et al. 2008). Afin de promouvoir à nouveau une croissance axonale, ils ont réactivé la voie mTOR dans les CGR adultes en délétant PTEN (phosphatase and tensin homolog) qui est un inhibiteur de la voie mTOR. Ainsi, en injectant des virus adéno-associés de type 2 exprimant la Cre recombinase (AAV2-Cre) dans les yeux de souris PTEN^{fl/fl}, ils ont supprimé l'expression de PTEN et permis la réactivation de mTOR dans les CGR. Ce faisant, ils observent pour la première fois une régénération robuste des axones des CGR sur plus d'un millimètre dans les nerfs optiques après un pincement de ces nerfs.

Grâce à cette étude, la manipulation de la voie mTOR et des capacités intrinsèques des neurones apparaît comme un moyen robuste de promouvoir la survie neuronale et la régénération axonale après une lésion du SNC. Ainsi, de nombreuses études ont utilisé par la suite ce paradigme appliqué au système visuel mais aussi à la moelle épinière.

La voie mTOR induit aussi la régénération dans d'autres systèmes comme le tractus cortico-spinal ou la reformation des circuits dopaminergiques (Liu et al. 2010; YaJun Zhang et al. 2012).

b- La voie JAK/STAT

La voie JAK/STAT est essentielle pour la survie et la régénération dans le SNC lésé, comme décrit plus loin. Il s'agit d'un système de transduction du signal qui permet la communication entre le milieu extracellulaire et l'expression génique dans le noyau. De nombreux facteurs de croissance, hormones ou cytokines utilisent la voie de transduction JAK/STAT. Elle est constituée d'un récepteur transmembranaire couplé à la kinase Janus (JAK : Janus kinase) et à une protéine de la famille des STAT (signal transducer and activator of transcription), principalement STAT3. Lorsqu'un ligand tel qu'une cytokine, vient se fixer sur le récepteur, celui-ci se multimérise, activant la kinase JAK. Celle-ci va à son tour phosphoryler le facteur de transcription STAT qui sera transporté, après dimérisation, jusqu'au noyau pour réguler la transcription génique en se fixant sur des séquences régulatrices de l'ADN. Parmi les ligands

de la voie JAK/STAT, on trouve de nombreuses cytokines et autres molécules qui sont surexprimées à la suite d'une lésion du SNC dont : IL-6, IL-11 (Interleukine-6 et -11), LIF (Leukemia inhibitory factor) et CNTF (ciliary neurotrophic factor). La voie JAK/STAT possède également de nombreux inhibiteurs dont la famille des protéines SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling), particulièrement SOCS3, qui inhibent JAK formant une boucle de rétrocontrôle négatif.

Le rôle de cette voie dans la régénération a été mis en évidence par le biais de la délétion de SOCS3, inhibiteur de JAK/STAT (Smith et al. 2009). En effet, en utilisant le modèle du nerf optique, l'injection d'AAV-Cre dans les yeux de souris SOCS3^{fl/fl} a permis de déléter SOCS3 spécifiquement dans les CGR. Dans ces conditions, la régénération axonale dans le nerf optique après lésion est significativement améliorée. De plus, une augmentation du niveau d'expression de CNTF a été observée à la suite de la délétion de SOCS3 (Müller et al. 2009). De plus, la surexpression de CNTF (via une injection d'AAV-CNTF dans l'œil) induit une augmentation de la survie des CGR et une régénération de leur axone chez le rat adulte (Leaver et al. 2006). C'est pourquoi les chercheurs ont émis l'hypothèse que CNTF pourrait encore améliorer la régénération du SNC : en combinant la délétion de SOCS3 à l'injection de CNTF, la régénération est augmentée de manière importante (Smith et al. 2009).

Basée sur le modèle des DRG, une autre étude a mis en évidence le rôle de la voie JAK/STAT dans la différence de capacités régénératives entre le SNC et le SNP. En effet, les DRG comportent une branche périphérique qui constitue le nerf sciatique capable de régénérer après une lésion, et une branche centrale qui compose la colonne dorsale de la moelle épinière, appartenant au SNC et donc incapable de régénérer. La délétion de STAT3 dans les DRG induit une perte de régénération de la branche périphérique alors que sa surexpression cause une augmentation de la croissance des axones de la branche centrale (Bareyre et al. 2011).

c- Les facteurs de transcription

Des facteurs de transcription peuvent également être modulés afin de promouvoir la régénération du SNC. Les facteurs de transcription ont la capacité de se lier à des séquences régulatrices de l'ADN telles que des promoteurs et ainsi moduler l'expression des gènes selon le type cellulaire ou le contexte cellulaire. Ce sont d'ailleurs des facteurs de transcription (ATF-3) qui sont à l'origine de la réponse à la lésion observée dans le SNP et donc de la régénération qui en découle. Ainsi, les facteurs de transcription sont d'excellents candidats à moduler afin de promouvoir la régénération axonale. Il y a de plus en plus de facteurs de transcription qui sont impliqués dans la régénération du SNC. Ici, nous ne détaillerons que les plus étudiés.

En bloquant la transcription des CGR embryonnaires par l'ajout d'actinomycine D, on observe un maintien de la capacité des axones en cours de maturation à régénérer, par opposition à leur perte de potentiel de repousse en conditions normales (Moore et al. 2009). Les facteurs de transcription voient leur expression augmenter au cours du développement, jusqu'à des âges postnataux, suggérant leur implication dans la perte de capacités régénératives au cours du temps. Parmi ceux dont l'expression s'intensifie, on trouve la famille des KLF (Krüppel-like factor). KLF4 est le principal responsable de l'inhibition de la pousse neuritique puisqu'il la diminue de 50% entre E17 (jour embryonnaire 17) et P21 (jour postnatal 21). En délétant KLF4 dans les CGR en cours de développement, on observe une augmentation de la pousse des neurites des CGR à P12 *in vitro*. *In vivo*, chez les animaux délétés de KLF4 au cours du développement, on observe une augmentation significative de la régénération des axones des CGR après la lésion du nerf optique (Moore et al. 2009).

Parmi les facteurs de transcription impliqués dans la régénération, on trouve également Sox11. Sox11 fait partie du groupe C de la famille de facteurs de transcription appelée **SRY-related high mobility group HMG box** (Sox), tout comme Sox4 et Sox12. Les SoxC sont connus pour réguler le devenir des cellules, leur différenciation et leur survie au cours du développement. Plus particulièrement, les gènes SoxC sont impliqués dans la différenciation et le guidage des CGR qui envoient leur axone du côté controlatéral ; en leur absence tous les CGR projettent leur axone ipsilatéralement (Kuwajima et al. 2017). Après la naissance, les Sox ont leur expression qui diminue. Cependant, en comparant l'expression des protéines dans des DRG intacts et des DRG après une lésion du nerf sciatique, Sox11 fait partie des protéines dont l'expression augmente significativement après une lésion du SNP (Tanabe et al. 2003). Sox11 participe à la régénération axonale post-lésion du SNP. Il se trouve que Sox11 régule des gènes promouvant la repousse neuritique et la survie cellulaire dans des cultures primaires de DRG (Jankowski et al. 2006). Et *in vivo*, l'injection de siRNA contre Sox11 dans des DRG lésés inhibe la régénération dans le nerf saphène (Jankowski et al. 2009). De plus, Sox11 semble également être impliqué dans la régénération du SNC. En effet, l'injection d'AAV2-Sox11 dans les yeux, suivie du pincement du nerf optique deux semaines plus tard, aboutit à une régénération des CGR dans le nerf optique deux semaines après la lésion (Norsworthy et al. 2017). Cependant, bien que Sox11 induise une régénération, il est responsable d'une augmentation de la mortalité des CGR, en particulier des α -CGR qui sont normalement les cellules qui régénèrent le mieux en répondant à la voie mTOR (Duan et al. 2015). Ceci suggère que les phénomènes de survie et de régénération sont décorrélés.

Enfin, le facteur de transcription c-myc fait partie des protéines dont l'expression est modulée par la lésion dans les CGR adultes (Belin et al. 2015). C-myc est connu pour être un régulateur majeur du métabolisme cellulaire qui contrôle la transcription de très nombreux gènes (Dang

2013), ce qui fait de lui un bon candidat pour permettre la régénération des CGR. Ainsi, en surexprimant c-myc dans les CGR via l'injection d'AAV2-c-myc dans les yeux, on observe une augmentation de la survie des CGR ainsi que leur régénération dans le nerf optique (Belin et al. 2015).

d- Les modifications épigénétiques

Les facteurs de transcription ainsi que les modifications épigénétiques permettent la régulation de l'expression génique selon le contexte cellulaire. Les mécanismes épigénétiques consistent en une modification de l'expression génique via une modulation de la structure de la chromatine sans modifier la séquence génétique. Cette modification de structure va moduler la capacité de la machinerie de transcription à se lier à l'ADN et donc réguler l'expression des gènes. Parmi les modifications épigénétiques, on trouve les acétylations réalisées par les acétyltransférases, qui ont lieu sur des lysines présentes sur la séquence terminale des histones. Elles ont pour conséquence un relâchement de la chromatine, permettant une lecture plus facile par la machinerie transcriptionnelle. D'une part, en surexprimant l'acétyltransférase p300 dans les CGR, on observe une régénération des CGR de 0.5mm dans le nerf optique de la souris, soit plus de la moitié du nerf optique. D'autre part, en inhibant les désacétyltransférases (qui suppriment les acétylations) dans CGR, on n'observe pas de régénération mais une augmentation de la survie des CGR (Gaub et al. 2011). Outre les histones, l'ADN peut directement être la cible de modifications épigénétiques telles que des méthylations. La plus courante est l'ajout d'un groupement méthyl sur les cytosines de l'ADN (5-méthylcytosine, 5mC) par les ADN-méthyltransférases (DNMT : DNA-(cytosine5)methyltransferase). Ces méthylations induisent une répression de la transcription.

e- Les approches combinatoires

Toutes les modulations des capacités intrinsèques des neurones du SNC en vue de permettre leur repousse après une lésion n'induisent qu'une régénération à courte distance. Afin de permettre aux axones de croître suffisamment pour conduire à une reconnexion totale et fonctionnelle des circuits, des approches combinatoires ont été mises au point. Ces dernières consistent à combiner différents moyens identifiés pour faire régénérer les axones du SNC à plus longue distance. La plupart d'entre elles font intervenir l'activation de la voie mTOR (par la délétion de PTEN) qui est combinée à différentes approches (Figure 6).

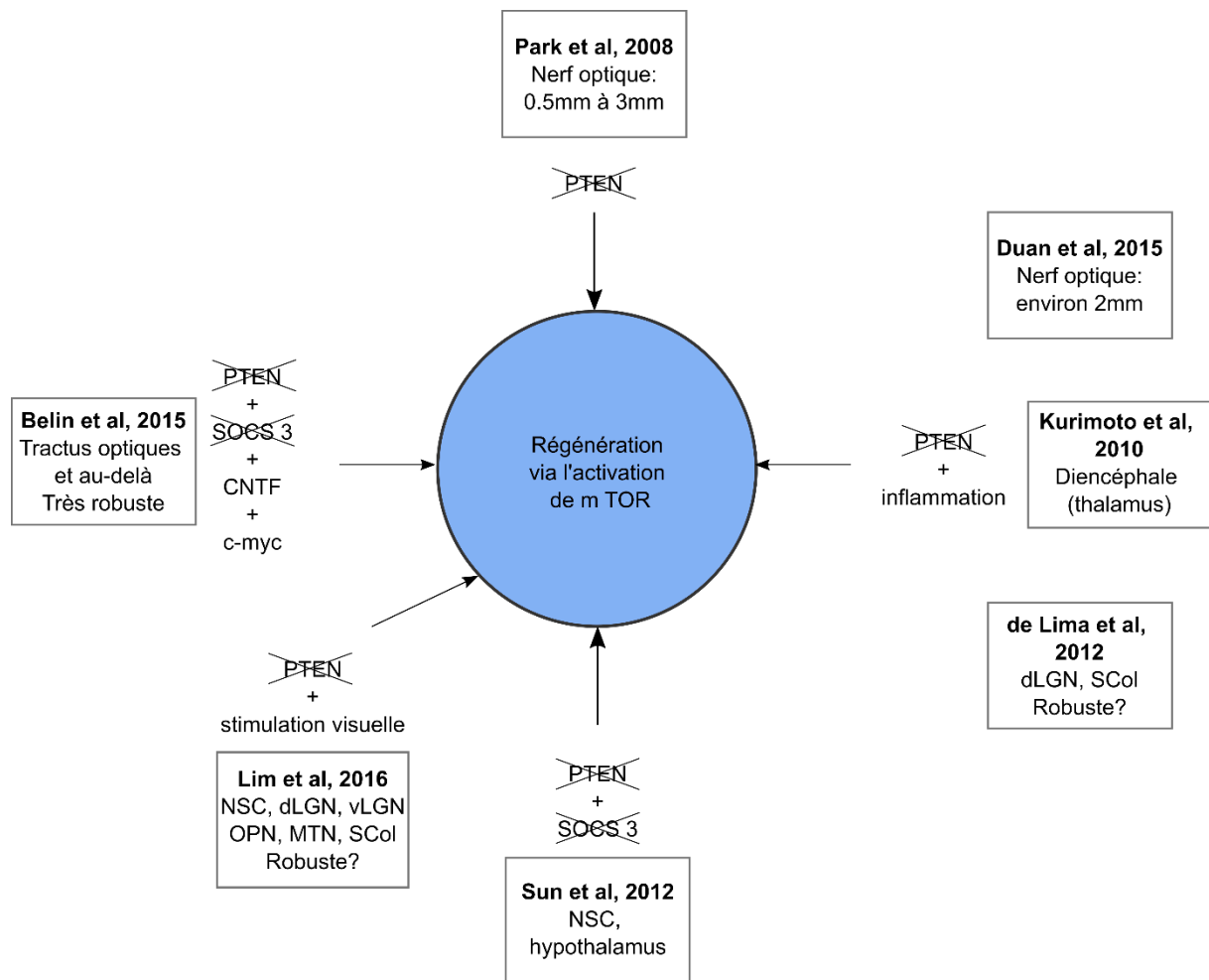


Figure 6 : Les modèles de régénération faisant intervenir la voie mTOR

Afin d'obtenir une régénération dans le système nerveux central, la voie mTOR peut être réactivée, notamment en déléant son inhibiteur PTEN. Les croix définissent des délétions. Afin de potentialiser cet effet régénératif, l'activation de la voie mTOR peut être associée à d'autres modulations telles que l'induction de l'inflammation, la délétion de SOCS3, une stimulation visuelle ou la surexpression de CNTF et c-myc. Dans chaque cadre se trouve la publication correspondante ainsi que l'étendue de la régénération axonale dans chaque modèle.

NSC, Noyau SupraChiasmatique, d/vLGN Noyau Genouillé Latéral dorsal/ventral, OPN Noyau Oligaire Prétectal, MTN, Noyau Terminal Médial, SCol Colliculus Supérieur.

e.1- Délétion de PTEN et induction de l'inflammation

La délétion de PTEN (c'est-à-dire l'activation de la voie mTOR) peut s'accompagner de l'injection de différents composés dans le but de produire une inflammation contrôlée. En effet, l'inflammation peut dans certaines conditions favoriser la régénération. Les cellules de l'inflammation recrutées après la lésion, vont sécréter des facteurs de croissance ou d'autres molécules comme l'oncomoduline. Cette dernière se lie à ses récepteurs sur les CGR d'une

manière dépendante de l'AMPC ; c'est pourquoi de l'AMPC est co-injecté. Enfin, ces deux effets sont combinés à la délétion de PTEN. De cette façon, on observe une régénération des axones des CGR jusqu'au bout du nerf optique, dont la moitié parvient à traverser le chiasma optique (Kurimoto et al. 2010). La délétion de PTEN a également été combinée à l'injection de fibrine de saumon au niveau du site de lésion (hémisection de la moelle épinière au niveau cervical) permettant la régénération du tractus corticospinal et l'amélioration des fonctions motrices chez le rat (Lewandowski et Steward 2014).

De plus, en se focalisant sur le taux de survie des différentes populations de CGR, il se trouve que certaines sous-populations survivent mieux que d'autres à la lésion. C'est le cas des CGR- α . Ces CGR expriment spécifiquement l'ostéopontine et les récepteurs pour le facteur de croissance mimant l'insuline (insuline-like growth factor 1 – IGF1). En injectant l'ostéopontine et IGF1 dans les yeux, on observe une régénération des axones des CGR aussi importante que celle observée lors de la délétion de PTEN (Duan et al. 2015). Enfin, l'étude de de Lima et collaborateurs (de Lima et al. 2012) combine la délétion de PTEN avec l'injection de Zymosan (provoquant une inflammation) et d'AMPC (renforce la régénération). Dans cette étude, les axones régénèrent à longue distance et semblent connecter différentes cibles cérébrales (dLGN, SCol), cependant le retour des fonctions qui en découlent reste très partiel.

e.2- Délétion de PTEN et de SOCS3

Lorsque PTEN et SOCS3 sont délétés, on observe dix fois plus d'axones qui atteignent un point à 2 mm du site de lésion (partie distale du nerf optique), et parmi les axones qui régénèrent, 20% atteignent la région proximale du chiasma optique (Sun et al. 2011). Cette double délétion améliore la distance de régénération, mais aussi le taux de survie des CGR 4 semaines après la lésion. Dans le modèle de pyramidotomie du tractus corticospinal, la délétion de PTEN et de SOCS permet aux axones corticospinaux de faire de nouvelles branches et ainsi de retrouver des fonctions motrices au niveau des membres antérieurs (Liu et al. 2010; Jin et al. 2015).

e.3- Délétion de PTEN et stimulation visuelle

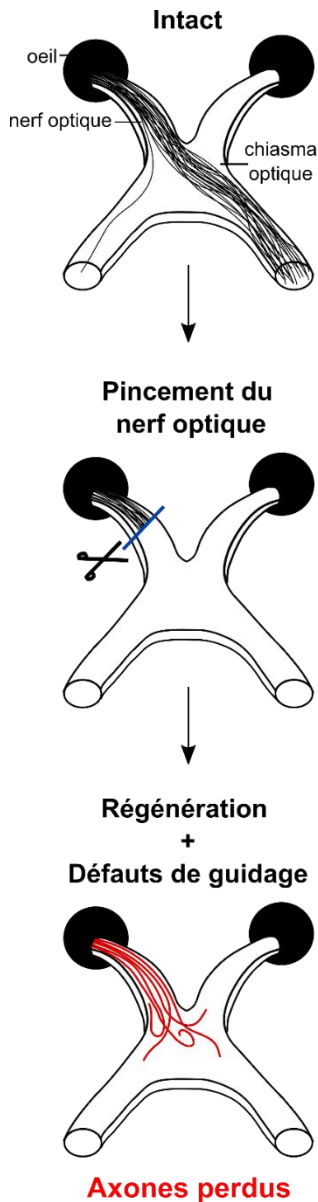
L'activation de la voie mTOR via l'injection intravitreuse d'AAV2-Rheb (un régulateur positif de cette voie) combinée à une stimulation visuelle (contrastes) promeut une régénération longue distance dont certains axones vont même jusqu'à réinnervier certaines régions du cerveau chez la souris. Cependant ces réinnervations sont peu robustes et très peu reproductibles entre les individus (Lim et al. 2016).

e.4- Délétion de PTEN et SOCS3 et surexpression de CNTF et c-myc : modèle PSM

Enfin, une des approches combinatoires les plus robustes consiste en l'association de la délétion de PTEN (activation de la voie mTOR), de la délétion de SOCS3 et la surexpression de CNTF (activation de la voie JAK/STAT) et de la surexpression du facteur de transcription c-myc (Belin et al. 2015) (Figure 7). Grâce à ces modulations génétiques, les axones parviennent à atteindre le chiasma optique et même plus loin, les tractus optiques. Le nombre d'axones qui atteignent le chiasma est multiplié par 3 comparé aux modèles d'activation de mTOR et JAK/STAT seulement. C'est ce modèle appelé PSM (PTEN SOCS c-Myc) que nous utilisons principalement dans l'équipe dans le but de reconstruire le circuit neuronal du système visuel chez l'adulte et qui sera largement abordé lors de mes travaux de thèse.

V- Défauts de guidage des axones en cours de régénération

Grâce à la modulation des voies mTOR, JAK/STAT et c-myc, nous avons obtenu un modèle de régénération à longue distance que nous appelons le modèle PSM : dans ce modèle, les axones en cours de régénération poussent jusqu'au chiasma optique et au-delà. Bien que cette régénération soit robuste et à longue distance, les axones présentent de graves défauts de guidage qui compromettent la reconstruction d'un circuit nerveux fonctionnel (Figure 7).



Modèle de régénération longue distance PSM et défauts de guidage observés

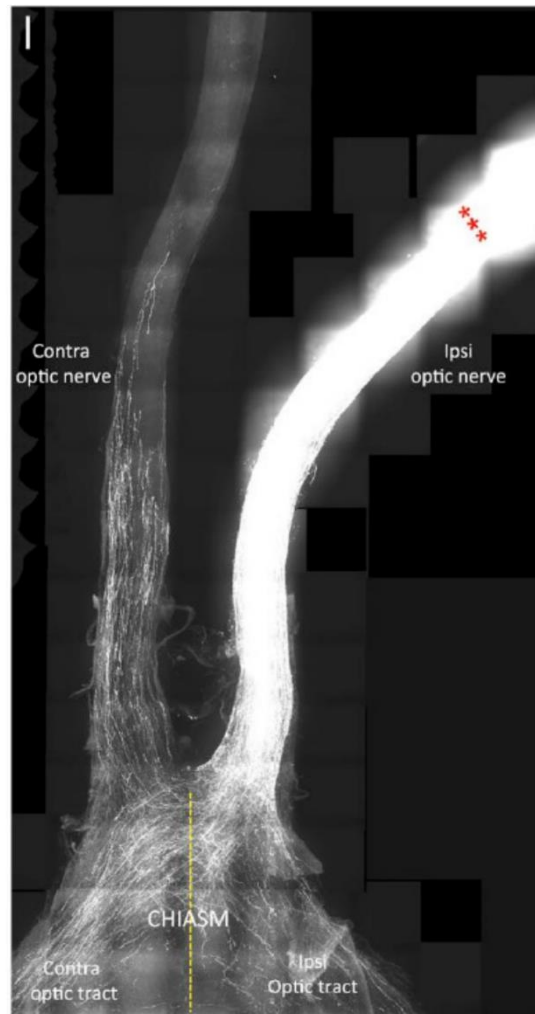


Figure 7 : Modèle PSM de régénération à longue distance et défauts de guidage engendrés

Afin de modéliser une lésion du système nerveux central et d'étudier sa régénération, on utilise le modèle du pincement de nerf optique. Cette lésion est suivie par la dégénération des axones qui constituaient le nerf optique. Grâce à des modulations génétiques telles que la délétion de PTEN et SOCS et la surexpression de CNTF et c-myc (modèle PSM), on obtient une régénération longue distance qui s'étend au-delà du chiasma optique. Cependant, les axones qui ont régénéré présentent de graves défauts de guidage : ils sont perdus au niveau du chiasma optique, retournent vers l'œil duquel ils sont issus ou se dirigent vers l'autre œil. Image confocale : les axones qui régénèrent sont en blanc et les étoiles rouges définissent le site de lésion. **Adaptée de Axon guidance in regeneration of the mature CNS : step by step, Schaeffer, Vilallongue & Nawabi, 2023, Neural Regeneration Research et Injury-induced decline of intrinsic regenerative ability revealed by quantitative proteomics, Belin et.al, 2015, Neuron**

En effet, les axones sont perdus au niveau du chiasma optique et ne connectent donc pas leurs cibles correctes dans le corps. De plus, les projections anarchiques peuvent provoquer la formation de circuits aberrants, d'autant plus délétères pour la reformation d'un circuit fonctionnel (Wang et al. 2015). Par exemple, au niveau du chiasma optique, les axones des CGR n'assurent plus une décussation normale devant permettre la vision binoculaire. Aussi, certains axones partant d'un œil peuvent revenir vers cet œil ou aller connecter l'œil opposé. Tous ces défauts de guidage nuisent à la reformation du circuit nerveux visuel chez l'adulte, et ont été observés dans de nombreuses études (Belin et al. 2015; Sun et al. 2011; de Lima et al. 2012; Pernet et Schwab 2014).

Dans le prochain chapitre, nous étudierons ce qu'est le guidage axonal ainsi que les différentes familles de molécules de guidage, leurs structures et leurs fonctions.

Chapitre 2 : Le guidage axonal

Au cours du développement, des milliers d'axones naviguent sur de longues distances afin d'atteindre leurs cibles dans le corps. C'est la connexion des axones à leurs cibles appropriées qui permet la formation d'un circuit nerveux fonctionnel. Afin de savoir dans quelle direction les axones doivent se diriger, ils possèdent à leur extrémité distale une structure particulière appelée le cône de croissance, qui agit comme un senseur de l'environnement. Il est constitué de microtubules, en son centre, qui sont entourés par des filaments d'actine. Le cône de croissance va rencontrer tout au long de son trajet des molécules de guidage permissives ou non à sa navigation. Le cône de croissance ne peut répondre à une molécule de guidage que s'il exprime son récepteur à sa surface. L'interaction d'un facteur de guidage avec son récepteur modifie le cytosquelette d'actine du cône de croissance et permet de modifier sa trajectoire. Ces molécules de guidage agissent donc tels des signaux indiquant aux axones en cours de croissance le chemin à emprunter (**Figure 8**).

Les molécules de guidage sont multiples : elles peuvent être attractives ou répulsives et peuvent agir à courte ou à longue distance. Dans un premier temps, Ramon y Cajal a proposé un mécanisme de chémo-attraction pour expliquer la formation des circuits nerveux : les cellules sécrètent des molécules attractives qui attirent les axones en cours de croissance vers elles. Ensuite, un mécanisme de chémo-répulsion à longue distance a été mis en évidence par Colamarino et Tessier-Lavigne ([Colamarino et Tessier-Lavigne 1995](#)). Par ailleurs, des mécanismes de guidage à courte distance faisant intervenir des molécules de guidage transmembranaires ainsi que des molécules de la matrice extracellulaire ont été identifiés. Parmi ces molécules, on trouve la laminine et la fibronectine ([Pires-Neto, Braga-de-Souza, et Lent 1999](#)). Ainsi, les axones en cours de croissance avancent sur un substrat adhésif et permissif ([Tessier-Lavigne et Goodman 1996](#)) (**Figure 8**).

De plus, dans le but d'assurer la parfaite trajectoire des axones, leur parcours est divisé en de plus petites portions par des cibles intermédiaires ou des zones de choix (« choice points ») précis. Il s'agit de groupes de cellules, localisés à des positions stratégiques. Celles-ci sécrètent différentes molécules de guidage qui vont aiguiller les axones en cours de croissance jusqu'à leur cible suivante et/ou finale.

En plus d'amener un axone de son point de départ à sa cible finale, le guidage consiste également en une coordination très précise. En effet, chez les organismes bilatéraux, un niveau de complexité supplémentaire existe : les neurones situés de part et d'autre de la ligne médiane doivent coopérer afin d'assurer la coordination des deux côtés du corps. Par conséquent, le chiasma optique constitue l'une des cibles intermédiaires les plus étudiées

dans le domaine du guidage axonal. Comme décrit précédemment, dans le système visuel, les cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) projettent leur axone pour former le nerf optique. Lorsqu'ils arrivent dans la partie distale du nerf optique, les axones peuvent adopter différents comportements : ils peuvent rester du même côté que l'œil dont ils proviennent pour former les projections ipsilatérales, ou ils peuvent traverser la ligne médiane pour projeter de manière controlatérale dans le cerveau. Ce sont les axones qui croisent la ligne médiane qui forment le chiasma optique, situé juste au-dessous de l'hypothalamus. La proportion de projections ipsilatérales et controlatérales détermine le degré de vision en 3D. Par exemple, chez la souris, 95% des axones traversent la ligne médiane contre 5% restant du côté ipsilatéral. Chez l'homme, cette proportion est de l'ordre de 50-50% (Figure 3).

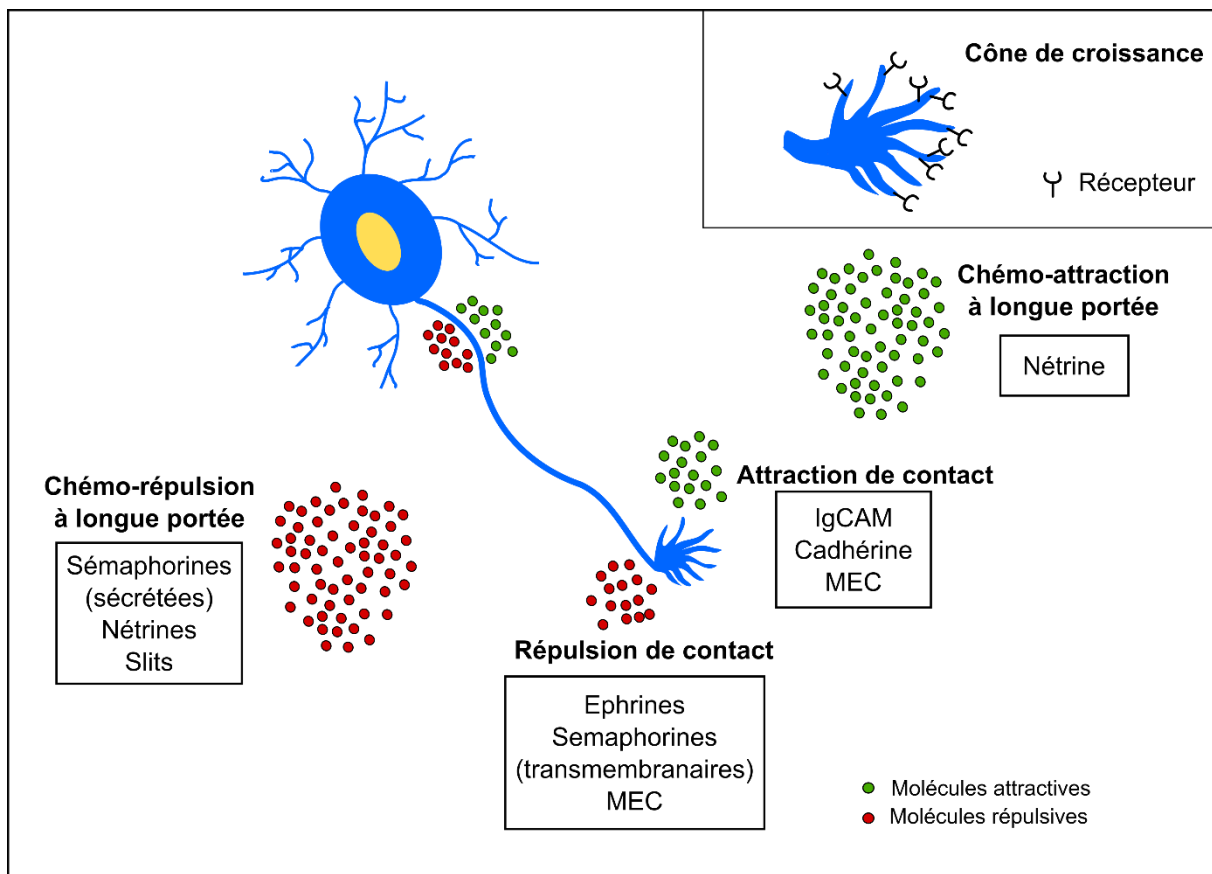


Figure 8 : Principe du guidage axonal au cours du développement

Schéma d'un neurone en cours de croissance dans son environnement. Les axones en cours de croissance présentent à leur extrémité une structure motile appelée le cône de croissance. Ce cône exprime à sa surface des récepteurs à des molécules de guidage qui sont présentes dans l'environnement des neurones. Ces molécules peuvent être attractives (l'axone va se diriger vers elles) ou répulsives (l'axone va les éviter). De plus, les molécules de guidage peuvent agir par contact avec le cône de croissance directement ou le cône de croissance peut les « sentir » de loin (chémo-attraction ou chémo-répulsion).

Au cours du développement, les axones poussent d'abord en direction de la ligne médiane grâce à un mécanisme d'attraction. D'une part, une fois que les axones controlatéraux ont traversé la ligne médiane, ils sont repoussés par les molécules de guidage présentes à la ligne médiane, qui les empêchent de la retraverser. Ils continuent ensuite leur navigation jusqu'à leurs cibles correctes dans le cerveau. D'autre part, les axones ipsilatéraux sont tout de suite repoussés par la ligne médiane et atteignent leurs cibles sans traverser le chiasma optique.

Les facteurs de guidage jouent donc un rôle primordial dans l'établissement correct des circuits neuronaux en ayant une synchronisation millimétrée et une communication essentielle avec l'environnement neuronal.

Ces molécules de guidage sont réparties en plusieurs familles. Il existe quatre familles principales de molécules de guidage : les nétrines, les sémaphorines, les slits et les éphrines. Au fil du temps, d'autres molécules possédant des fonctions de guidage axonal ont été mises en évidence. Parmi elles, on trouve des morphogènes, des facteurs de croissance, des composants de la matrice extracellulaire et des lipides.

I- Les nétrines

a- Découverte des nétrines

Des études anatomiques et comportementales chez *C. elegans* ont permis de décrire plus de 30 gènes impliqués dans les migrations cellulaire et axonale. Parmi eux, les gènes *unc-5* (« uncontrolled »), *unc-6* et *unc-40* ont été identifiés (Hedgecock, Culotti, et Hall 1990). La mutation de ces gènes chez *C. elegans* affecte le guidage axonal de nombreuses populations neuronales. Lorsque *unc-6* a été cloné, les chercheurs ont mis en évidence que ce gène codait pour une protéine associée à la laminine (Ishii et al. 1992). Quelques années plus tard, une molécule promouvant la croissance des axones commissuraux a été purifiée à partir de cerveau de poulet. Il s'agissait de Netrin, c'est-à-dire de l'homologue de *unc-6* chez *C. elegans* (Kennedy et al. 1994; Serafini et al. 1994).

b- Structure des nétrines et de leurs récepteurs

Chez les mammifères, il existe 3 familles de nétrines sécrétées (1, 3 et 4) et 2 familles de nétrines liées à la membrane par une ancre de glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Netrin-G1 et Netrin-G2) (Nakashiba et al. 2000; Sun, Correia, et Kennedy 2011) (Figure 9-A). Ces protéines contiennent approximativement 600 acides aminés et font partie de la superfamille des protéines associées à la laminine. En effet, le domaine N-terminal des nétrines et les domaines V et VI des laminines présentent une forte homologie. Pour les nétrines 1 à 4, ces domaines sont suivis d'un domaine C-terminal appelé « domaine C » ou « netrin like (NTR) module ».

Les nétrines interagissent avec différents récepteurs. Parmi eux, on trouve DCC (« deleted in colorectal carcinoma »), une protéine transmembranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines qui possède trois domaines intracellulaires (**Figure 9-A**). On trouve également UNC5 : ces protéines transmembranaires possèdent des domaines immunoglobulines et laminines. Enfin, DSCAM (Down Syndrome Adhesion Molecule) agit comme un récepteur des nétrines qui induit des réponses particulières selon ses co-récepteurs. Il possède également de nombreux domaines immunoglobulines, ainsi que plusieurs domaines de fibronectine de type III.

c- Expression et fonctions des nétrines

Les nétrines sont exprimées dans le système nerveux mature et en cours de développement. Chez l'embryon, les nétrines se retrouvent dans le cerveau, le cervelet, la moelle épinière et les disques optiques ([Serafini et al. 1996](#); [Deiner et al. 1997](#)). Elles restent exprimées dans le système nerveux mature mais elles montrent un profil d'expression différent.

c.1- L'interaction Netrin/DCC a un effet attractif

La réponse cellulaire aux nétrines est dépendante du récepteur avec lequel elles interagissent : elles peuvent être attractives ou répulsives. En effet, en se liant à son récepteur DCC, Netrin1 a un effet attractif. Ce rôle attractif a largement été étudié via l'utilisation de « turning assays » (observation de la réponse d'un axone en cours de croissance par rapport à une molécule ajoutée dans son environnement) ([De La Torre et al. 1997](#); [Ming et al. 1997](#)) et de co-cultures de tissu neuronal avec des cellules exprimant les nétrines ([Kennedy et al. 1994](#); [Serafini et al. 1994](#)).

Dans le système visuel, Netrin1 est fortement exprimée par le disque optique, lieu de sortie des axones de la rétine. L'analyse des mutants hypomorphes pour Netrin1 révèle une hypoplasie du nerf optique ([Deiner et al. 1997](#)) (**Figure 9-B**). De plus, chez les embryons de souris invalidés pour DCC, de nombreux axones ne parviennent pas à atteindre le disque optique ([Deiner et al. 1997](#)) (**Figure 9-B**). Ces résultats mettent en évidence le rôle essentiel de Netrin1/DCC dans la formation du nerf optique. Puisque la délétion de DCC est létale dès la naissance, il est difficile d'évaluer la contribution de ce récepteur dans la formation des circuits neuronaux. C'est pourquoi des chercheurs ont choisi de déléter DCC spécifiquement dans les rétines de souris mutantes. Ainsi, ils ont pu révéler le rôle clé de DCC dans le développement de la rétine ([Vigouroux et al. 2020](#)). En effet, grâce à ce modèle, ils ont observé que les axones des CGR n'exprimant plus DCC ne sont plus capables de sortir de la rétine pour entrer dans le nerf optique. De plus, de nombreux axones de CGR présentent des défauts d'orientation au sein-même de la rétine mais aussi des défauts de projections dans leurs cibles cérébrales. Par exemple, les CGR ipsilatéraux innervant le corps genouillé latéral et le colliculus supérieur étendent de manière exagérée leur territoire dans ces cibles. La délétion

de DCC induit également une modification des projections des CGR : les projections normalement présentes entre le noyau terminal médial ventral et le MTN dorsal, dans le système optique accessoire, sont totalement absentes (Vigouroux et al. 2020).

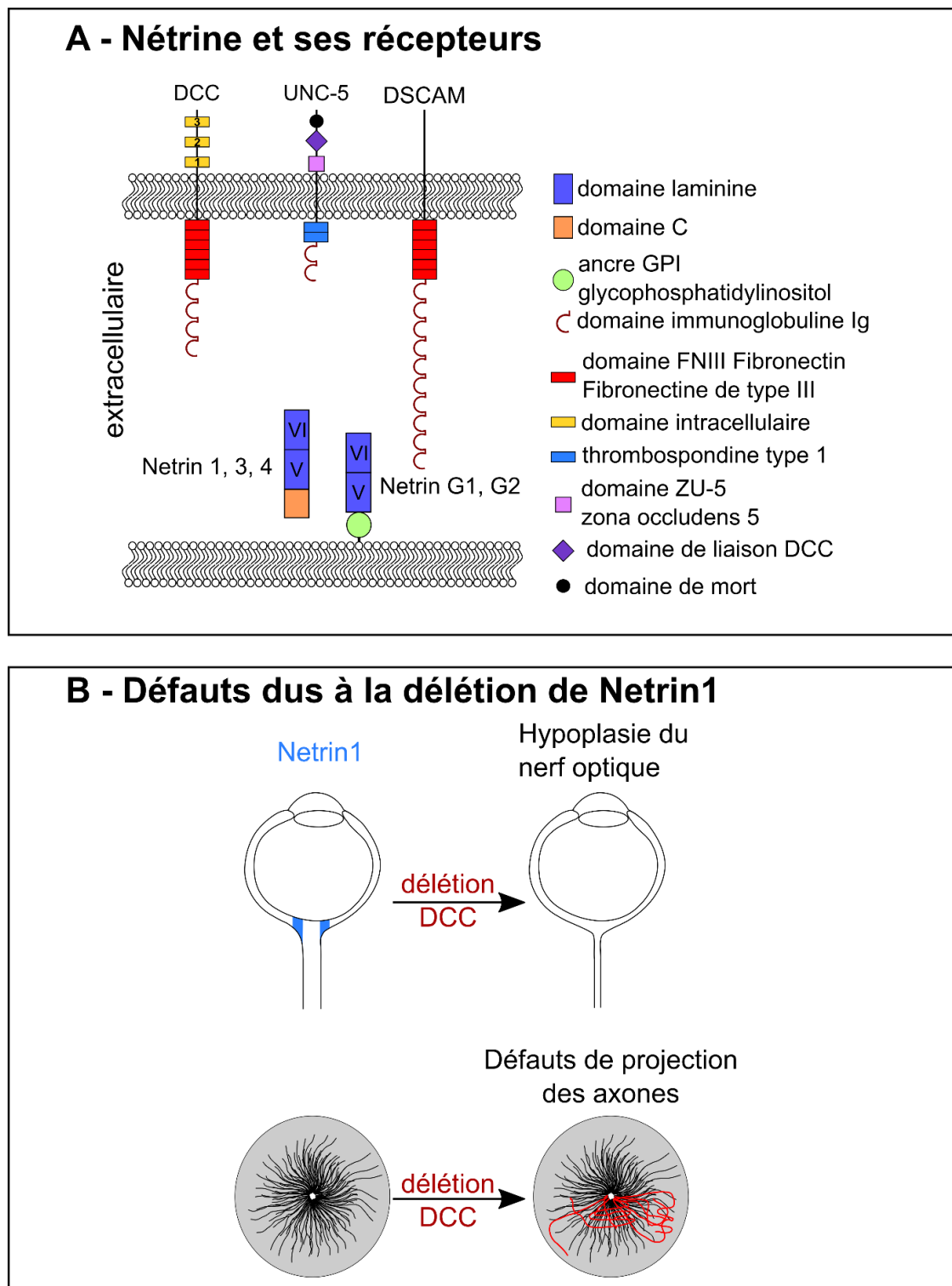


Figure 9 : Les nétrines

(A) Structure des ligands nétrines (Netrin1, 3, 4 et NetrinG1 et G2) et de leurs récepteurs (DCC, UNC-5 et DSCAM). (B) Défauts de guidage observés suite à la délétion de Netrin1.

c.2- L'interaction Netrin/UNC5A-D a un effet répulsif

Netrin possède d'autres récepteurs tels que UNC5A-D, un orthologue de UNC5 chez *C. elegans*. L'interaction entre Netrin et ce récepteur induit un comportement répulsif d'une manière dépendante ou non de DCC (Colamarino et Tessier-Lavigne 1995; Hong et al. 1999; Hao Wang et al. 1999). Même si les récepteurs UNC5 ont été beaucoup moins étudiés, il semblerait que le domaine intracellulaire des récepteurs aux nétrines soit responsable de cet effet de dualité dans le guidage axonal. Lorsque les domaines intracellulaires de DCC et de UNC5 sont expérimentalement échangés, la réponse de guidage obtenue sur les neurones commissuraux correspond à celle du domaine intracellulaire. Autrement dit, c'est le domaine intracellulaire du récepteur des nétrines qui va définir la réponse spécifique du cône de croissance (Hong et al. 1999).

c.3- L'interaction Netrin/DSCAM peut avoir différents effets

Chez les mammifères, les nétrines contribuent à la fois à la croissance axonale et au guidage comme démontré avec les expériences de « turning assays ». Cependant, lorsque l'on bloque DCC à l'aide d'anticorps bloquants, on n'observe que peu ou pas d'effet sur la réponse de « turning ». Ceci suggère que d'autres récepteurs des nétrines sont impliqués dans cette réponse. C'est pourquoi, Ly et ses collaborateurs ont cherché d'autres récepteurs potentiels des nétrines qui contrôleraient le guidage, notamment celui des axones commissuraux dans la moelle épinière de souris en cours de développement (Ly et al. 2008). Les auteurs se sont demandés quel membre de la superfamille des immunoglobulines, possédant des homologies avec DCC, est exprimé dans la moelle épinière en cours de croissance. Ils ont mis en évidence l'expression du récepteur DSCAM dans les axones commissuraux lorsqu'ils naviguent vers puis traversent la « plaque du plancher » (ou « floor plate », FP). L'inhibition de DSCAM par électroporation d'ARNi (interférent) au niveau de la moelle épinière a pour conséquence des défauts de guidage des axones commissuraux, prouvant l'implication de DSCAM dans le guidage de ces derniers. DSCAM régule sa réponse en fonction de sa dépendance ou non à DCC.

D'une part, quand DSCAM est le co-récepteur de DCC, il joue un rôle dans les mécanismes d'attraction (Ly et al. 2008). D'autre part, lorsque DSCAM agit en tant que co-récepteur de UNC5, on observe un phénomène de répulsion (Purohit et al. 2012), qui va jusqu'à induire la collapse des cônes de croissance.

II- Les sémaphorines

a- Catégories et structure des sémaphorines

Les sémaphorines (ou sémas) constituent l'une des plus grandes familles de molécules de guidage. On compte plus de 30 sémas différentes : 20 chez les vertébrés, 10 chez les

invertébrés et les virus. On peut les catégoriser en 8 classes (**Figure 10-A**). Les classes 1 et 2 ne se trouvent que chez les invertébrés. Les classes 3, 4, 6 et 7 sont exprimées seulement chez les vertébrés. Les sémas de classe 5 se retrouvent à la fois chez les vertébrés et les invertébrés (**Yazdani et Terman 2006**). La 8^{ème} classe n'est présente que chez les virus. Certaines sémas sont transmembranaires (classes 1, 4, 5 et 6), d'autres sont sécrétées (classes 2, 3 et 8) et les sémas de la classe 7 sont liées à la membrane par une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol). Ainsi, les sémas peuvent agir à distance ou localement pour moduler le guidage axonal dans les systèmes nerveux central et périphérique. Elles sont caractérisées par un domaine Sema extracellulaire de 500 acides aminés, situé dans la région N-terminale.

b- Récepteurs des sémaphorines

Elles ont d'abord été décrites comme des facteurs de guidage répulsifs chez le poulet et étaient appelées « collapsines » car elles induisaient la collapse des cônes de croissance (**Luo, Raible, et Raper 1993**). Plus tard, on leur a découvert un rôle attractif, notamment pendant le développement des projections corticales (**Bagnard et al. 1998**). La dualité attraction-répulsion des sémaphorines est nécessaire pour la mise en place de structures : c'est le cas de Sema3B au niveau de la commissure antérieure (**Falk et al. 2005**). Grâce à une étude à grande échelle (« large-scale ») d'une librairie d'ADNc, Neuropiline a été identifiée comme le récepteur des Sema3 (**Figure 10-A**). En effet, chaque ADNc a été transfecté dans des cellules COS et Neuropiline a été « pêchée » spécifiquement avec Sema3A lors d'une analyse de « binding-assay » (**Kolodkin et al. 1997; He et Tessier-Lavigne 1997**). Il existe deux neuropilines (Nrp1 et Nrp2) qui se lient à Sema3 avec différentes affinités. Les neuropilines sont des protéines transmembranaires possédant 5 domaines extracellulaires. Nrp1 est le récepteur de Sema3A, Sema3C et Sema3D. Nrp2 se lie spécifiquement à Sema3B, Sema3C et Sema3F. Cependant, ces récepteurs ne sont pas capables de transduire le signal à cause de leur domaine cytoplasmique trop court. C'est pourquoi Nrp interagit avec un co-récepteur nommé Plexine. Toutes les sémas peuvent se lier et interagir directement avec leurs récepteurs plexines. Il existe 4 types de plexines (PlexA à PlexD). Les plexines sont des protéines transmembranaires possédant un domaine Sema N-terminal extracellulaire. Sema3E est la seule sémaphorine qui ne se lie qu'à une plexine (PlexD1) et non à une neuropiline (**Gu et al. 2005**). D'autres récepteurs aux sémas ont également été identifiés. Parmi eux, on trouve des intégrines (notamment pour Sema7A (**Pasterkamp et al. 2003**)) ou des récepteurs du système immunitaire tel que CD72 et Tim2 (pour Sema4A (**Kumanogoh et al. 2002; 2000**)). D'autres partenaires peuvent intervenir dans le complexe de récepteurs pour moduler la réponse axonale : c'est le cas pour Sema3 avec la superfamille des immunoglobulines Ig (**Castellani et al. 2000; Nawabi et Castellani 2011**), mais aussi du morphogène Sonic hedgehog (Shh) (**Parra et Zou 2010**).

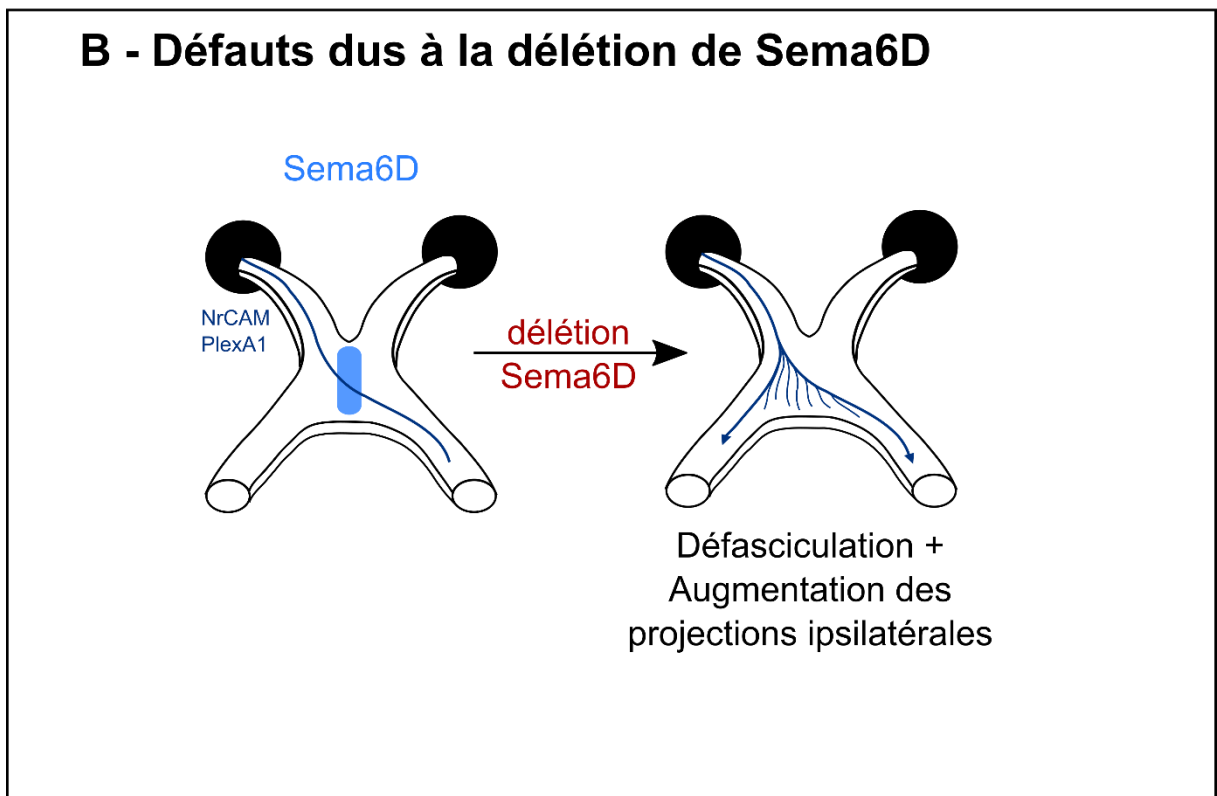
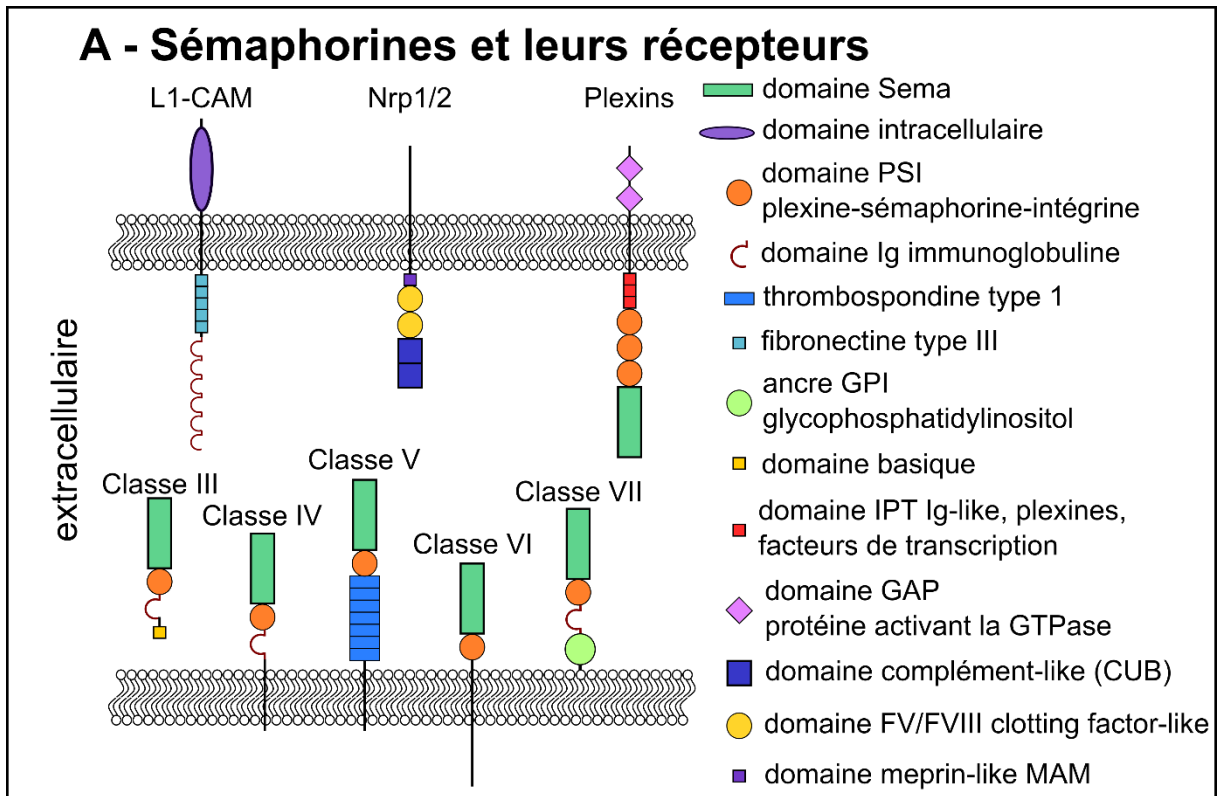


Figure 10 : Les sémaphorines

(A) Structure des ligands sémaphorines (de classe III, IV, V, VI et VII) et de leurs récepteurs (L1-CAM, Neuropiline Nrp1/2 et Plexins). (B) Défauts de guidage observés suite à la délétion de Sema6D dans les cellules ganglionnaires de la rétine.

c- Expression et fonctions des sémaphorines

Comme décrit précédemment, la vision binoculaire est assurée par les projections spécifiques des axones des CGR dans le cerveau. Ces projections ont une composante ipsilatérale et une composante contralatérale afin d'innervier les deux hémisphères du cerveau. Le ratio entre les projections ipsilatérales et contralatérales définit la largeur du champ visuel : par exemple, chez la souris, qui possède un petit champ visuel binoculaire, seulement 5% des axones projettent du même côté, alors que 95% des axones traversent la ligne médiane. Chez l'homme, qui possède un champ visuel binoculaire plus large, cette proportion est de 50-50%. Les mécanismes impliqués dans l'évitement de la ligne médiane sont bien décrits (Nakagawa et al. 2000; Williams et al. 2003; Lee, Petros, et Mason 2008). Cependant, les processus impliqués dans la traversée de la ligne médiane restaient incertains. Kuwajima et ses collaborateurs ont alors mis en évidence le fait que Sema6D est répulsif pour les axones des CGR (Kuwajima et al. 2012). La délétion de Sema6D dans les CGR induit une défasciculation des axones et une mauvaise décussation avec une augmentation du nombre de projections ipsilatérales (Kuwajima et al. 2012) (**Figure 10-B**). Les récepteurs de Sema6D sont PlexA1 et PlexA4 (Toyofuku et al. 2004; Yoshida et al. 2006). Cependant, il a été démontré que NrCAM peut être un récepteur de Sema6D. De plus, lorsque Sema6D interagit avec NrCAM et PlexA1, une augmentation de la croissance axonale est observée (Kuwajima et al. 2012). Ce mécanisme est inédit puisqu'il implique un partenariat tripartite : les axones des CGR expriment à la fois PlexA1 et NrCAM tandis que NrCAM, PlexA1 et Sema6D sont exprimés au niveau du chiasma optique. Tous ces acteurs sont essentiels pour que les axones puissent traverser correctement la ligne médiane. En effet, l'absence d'un seul d'entre eux induit des défauts de projections des axones ainsi qu'une augmentation de la quantité d'axones ipsilatéraux.

III- Les éphrines

a- Structures et récepteurs des éphrines

Contrairement aux nétrines et aux sémaphorines sécrétées, les éphrines sont des molécules de guidage agissant à courte distance, car liées à la membrane. En effet, elles sont classées en deux catégories, les éphrines à ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) correspondant aux EphrinA1 à EphrinA5 et les éphrines transmembranaires qui sont les EphrinB1 à EphrinB3. Leur partie extracellulaire est composée d'un domaine de liaison au récepteur (**Figure 11-A**).

Elles agissent à travers leur récepteur à activité tyrosine kinase nommés Eph : les EphA (il en existe 9 différents chez les mammifères) qui se lient aux EphrinA et les EphB (on en compte 5 chez les mammifères) qui interagissent avec les EphrinB. Cependant, il y a des exceptions

telles que EphA4 qui peut se lier aux deux classes d'éphrines (A et B) (Pasquale 2005). Les récepteurs Eph sont des protéines transmembranaires : elles possèdent un domaine tyrosine kinase intracellulaire et un domaine extracellulaire de liaison aux éphrines (Figure 11-A).

b- Fonction des éphrines

Les éphrines sont impliquées dans la traversée de la ligne médiane à différents niveaux dans le système nerveux. Contrairement aux nétrines et aux sémaphorines, les éphrines sont particulièrement impliquées dans le guidage des projections ipsilatérales. Les CGR provenant de la partie ventro-temporale de la rétine projettent préférentiellement du côté ipsilatéral du cerveau (Williams et al. 2003). Le récepteur EphB1 est spécifiquement enrichi dans ces axones. Le ligand EphrinB2 est exprimé par les cellules gliales présentes à la ligne médiane du chiasma optique. Ainsi, cette signalisation EphrinB2/EphB1 maintient les axones du même côté et empêche la traversée de la ligne médiane. Lorsque le récepteur est inhibé, les axones deviennent insensibles aux facteurs répulsifs de la ligne médiane et les axones contralatéraux peuvent la traverser (Williams et al. 2003) (Figure 11-B). Cette modulation d'EphB1 est assez méconnue. Un facteur de transcription particulier, Zic2 (zinc finger transcription factor 2) module l'expression d'EphB1. Zic2 est spécifiquement exprimé par les neurones dont les axones ne traversent pas la ligne médiane. L'expression de Zic2 corrèle avec le degré de binocularité au cours de l'évolution. Plus un organisme a une vision binoculaire, plus il a d'axones qui projettent ipsilatéralement, plus Zic2 est exprimé (Herrera et al. 2003). Au contraire, chez les animaux avec une vision panoramique tel que le poisson-zèbre n'ont pas de projections ipsilatérales et comme attendu, ils n'expriment pas Zic2 dans leurs rétines (Seth et al. 2006). De plus, la modulation de l'expression de Zic2 dans les CGR en cours de développement est suffisante pour modifier la proportion de projections des axones de contralatéral à ipsilatéral (García-Frigola et al. 2008). Enfin, différents groupes de recherche ont mis en évidence un lien direct entre l'expression de Zic2 et de EphB1 dans le cône de croissance des axones ventro-temporaux (Lee, Petros, et Mason 2008; García-Frigola et al. 2008). Ainsi, Zic2 contrôle l'expression d'EphB1 et donc la sensibilité des axones projetant ipsilatéralement par rapport à EphrinB2 présent à la ligne médiane. Le facteur de transcription Zic2 est également impliqué dans la modulation de l'expression du récepteur EphA4 (Escalante et al. 2013).

L'effet de l'interaction Eph/Ephrin est paradoxal : comme les éphrines sont des molécules de contact, l'adhésion entre le cône de croissance et la cellule partenaire est indispensable. Cependant, la plupart du temps, cette interaction induit un phénomène de répulsion. C'est pourquoi, il y a un rapide changement entre adhésion et rétraction du cône de croissance.

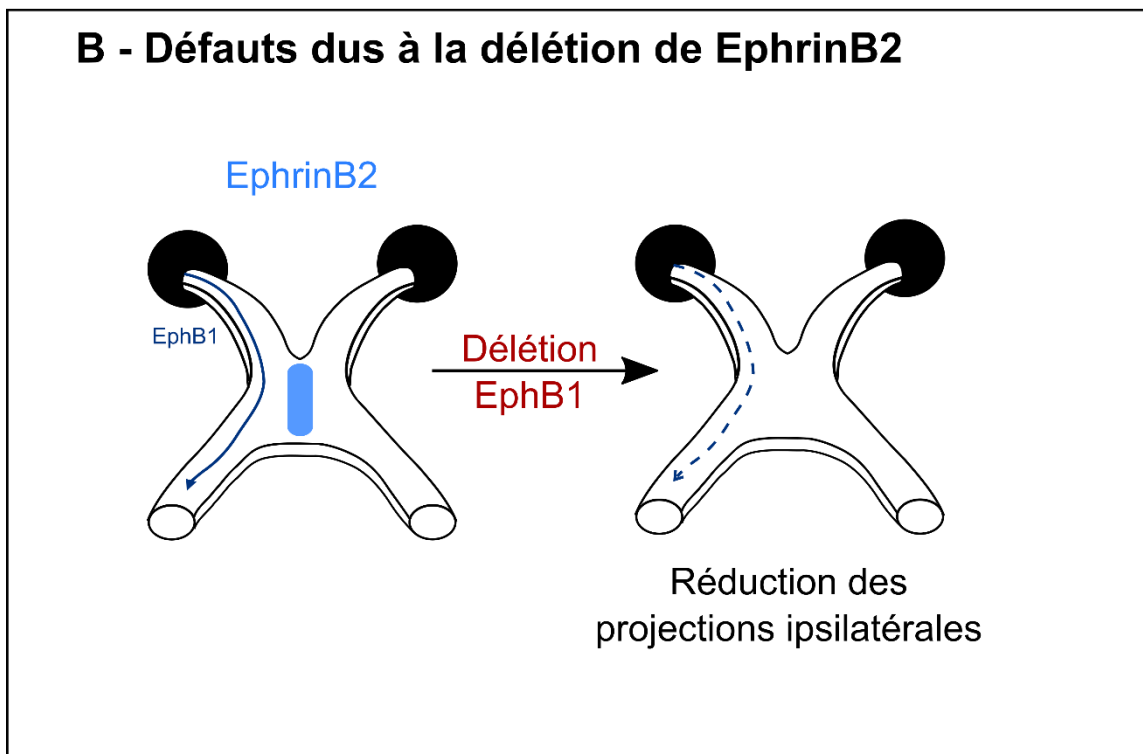
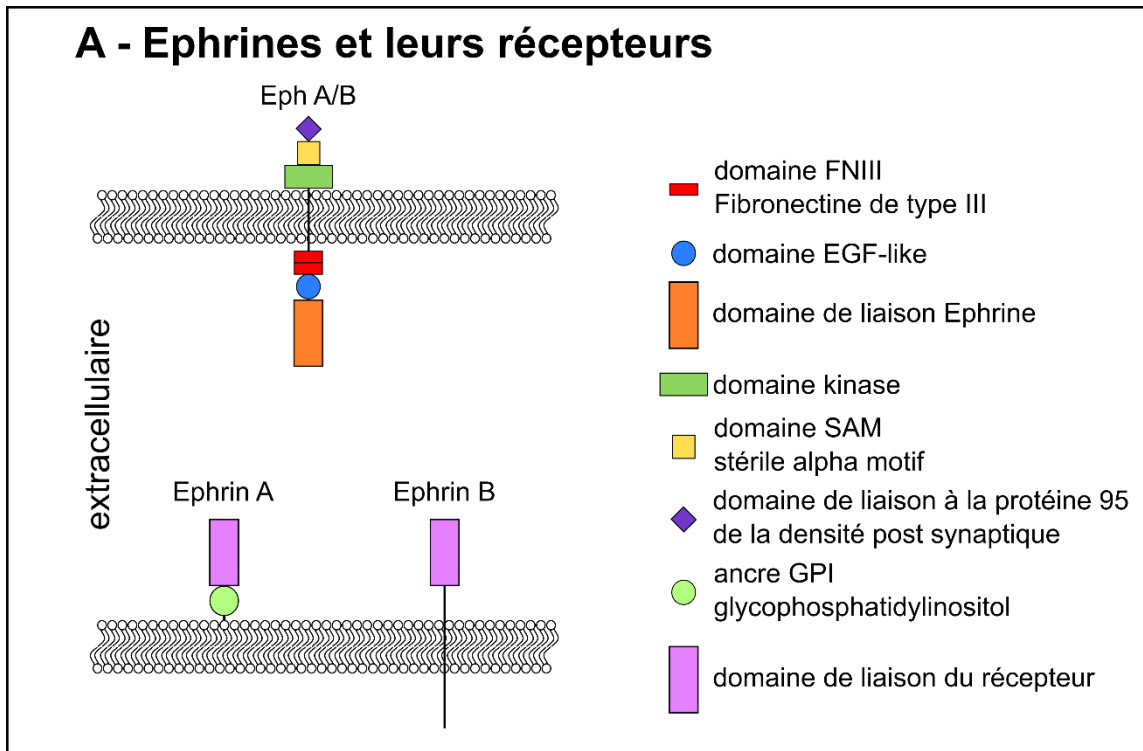


Figure 11 : Les éphrines

(A) Structure des ligands Ephrin (EphrinA et EphrinB) et de leurs récepteurs (EphA et EphB). (B) Défauts de guidage observés suite à la délétion de EphB1 dans les cellules ganglionnaires de la rétine.

Pour comprendre ce phénomène, quelques mécanismes ont été étudiés. Parmi eux, on trouve le clivage des éphrines par des métalloprotéases telles que ADAM10/Kuzbanian (Hattori, Osterfield, et Flanagan 2000). L'endocytose du complexe ligand/récepteur a également été étudiée : elle a lieu au moment de sa formation pour permettre le détachement du cône de croissance et de la cellule (Marston, Dickinson, et Nobes 2003; Zimmer et al. 2003).

IV-Les Slits

a- Structure des Slits et de leurs récepteurs

Les ligands Slits et leurs récepteurs Robos ont d'abord été découverts chez la drosophile. Ils ont ensuite été caractérisés dans la plupart des organismes en tant que facteur répulsif contrôlant le guidage des axones en cours de croissance dans le SNC et le SNP (Blockus et Chédotal 2016). Il existe 3 protéines Slits et 4 récepteurs Robos chez les mammifères. Les Slits sont des glycoprotéines sécrétées d'environ 200 kDa. Elles possèdent de nombreux domaines de type EGF ainsi que des domaines riches en leucine (Figure 12-A).

Les Robos sont des protéines transmembranaires possédant différents domaines intracellulaires, des domaines immunoglobulines et fibronectines extracellulaires (Figure 12-A). Robo1 et Robo2 ont été décrits les premiers (Kidd et al. 1998) en tant que récepteur de Slit permettant de médier sa réponse répulsive (Rothberg et al. 1988; Rothberg et al. 1990). Ensuite, Robo3 (Rig1) et ses isoformes Robo3.1 et Robo3.2 ont été mis en évidence mais leur rôle reste vague car ils ne possèdent pas de sites de liaison pour Slit (Chen et al. 2008). Ils pourraient réguler l'activité de Robo1/2. Enfin, Robo4 est particulier puisqu'il n'est pas impliqué dans le guidage axonal. En effet, il est exprimé par les cellules endothéliales et contrôle l'angiogenèse (Bedell et al. 2005; London et Li 2011).

Les Robos appartiennent à la famille des Ig-CAM, des immunoglobulines ayant un rôle de molécule d'adhésion cellulaire : ils peuvent ainsi médier des interactions homophiliques et hétérophiliques (Chédotal 2007).

b - Expression et fonctions de Slits

Les Slits sont exprimés à la ligne médiane ainsi que dans d'autres régions du cerveau. Chez les drosophiles mutantes pour Slit, on observe des défauts de projections des axones ipsilatéraux et commissuraux qui vont jusqu'à la ligne médiane et y restent figés (Rothberg et al. 1988; Rothberg et al. 1990). Ainsi, Slit a été décrit pour son rôle répulsif permettant de contrôler la sortie de la plaque du plancher (FP) et empêchant les axones de la retraverser (Kidd, Bland, et Goodman 1999). Grâce au modèle de la corde ventrale de la drosophile, les chercheurs ont pu étudier le fait que le cône de croissance ne devient sensible à Slit que lorsqu'il est proche de la FP. En effet, Keleman et ses collègues ont mis en évidence la protéine

transmembranaire Commissurless (Comm) qui contrôle le trafic des récepteurs Robo à la surface du cône de croissance (Keleman et al. 2002). Avant la traversée de la ligne médiane, Comm conduit Robo aux endosomes puis aux lysosomes pour qu'il soit dégradé. Un mécanisme encore inconnu induit la diminution de l'expression de Comm après la traversée de la ligne médiane, permettant l'expression de Robo à la membrane du cône de croissance : les axones deviennent alors sensibles à Slit, exprimé par les cellules de la ligne médiane, et en sont repoussés (Keleman, Ribeiro, et Dickson 2005). Par ailleurs, les mécanismes permettant l'expression de Comm dans les axones commissuraux ont été identifiés. D'une part, Frazzled (Fra), l'homologue de DCC chez la drosophile, contrôle l'expression de l'ARNm de Comm indépendamment de Netrin (Yang, Garbe, et Bashaw 2009). D'autre part, une protéine liant l'ARN nommée Elav module également l'expression de Comm. Chez les drosophiles mutantes pour Elav, l'expression de Comm est diminuée et des défauts de guidage sont alors observés au niveau de la corde ventrale (Simionato et al. 2007). Les travaux de Bashaw et ses collaborateurs ont identifié les protéines Ndfip1 et Ndfip2 comme les analogues fonctionnels de Comm chez les vertébrés. En effet, ces protéines recrutent Robo1 sur les endosomes et favorisent sa dégradation, permettant la traversée de la ligne médiane par les axones commissuraux au cours du développement (Gorla et al. 2019). Enfin, une protéase appelée Usp33 (« ubiquitin specific protease 33 ») a été décrite comme un partenaire de Robo1 et un potentiel candidat responsable de la régulation de son expression à la surface du cône de croissance permettant la traversée de la ligne médiane (Yuasa-Kawada et al. 2009).

D'autres mécanismes régulant la sensibilité des axones aux Slits présents à la ligne médiane ont été identifiés. L'un d'entre eux concerne Robo3 : il est exprimé avant la traversée ; son expression diminue ensuite permettant la traversée de la FP. La délétion de Robo3 induit de graves défauts de guidage : les axones commissuraux ne parviennent plus à atteindre la FP (Sabatier et al. 2004; Tamada et al. 2008). La délétion de Robo1 et Robo2, quant à elle, provoque un phénomène de pause de la part des axones au niveau de la FP (Kidd, Bland, et Goodman 1999).

Comme les autres récepteurs Robos, Robo3 est soumis à un épissage alternatif amenant aux variants Robo3.1 et Robo3.2 (Chen et al. 2008). Ces deux protéines ont des effets antagonistes sur le guidage des axones commissuraux à la ligne médiane. Robo3.1 est exprimé avant la traversée et semble inhiber la répulsion exercée par Robo1/Robo2. Robo3.2 est exprimé par les axones commissuraux après la traversée de la ligne médiane et collabore avec Robo1/Robo2 pour médier la réponse répulsive des Slits.

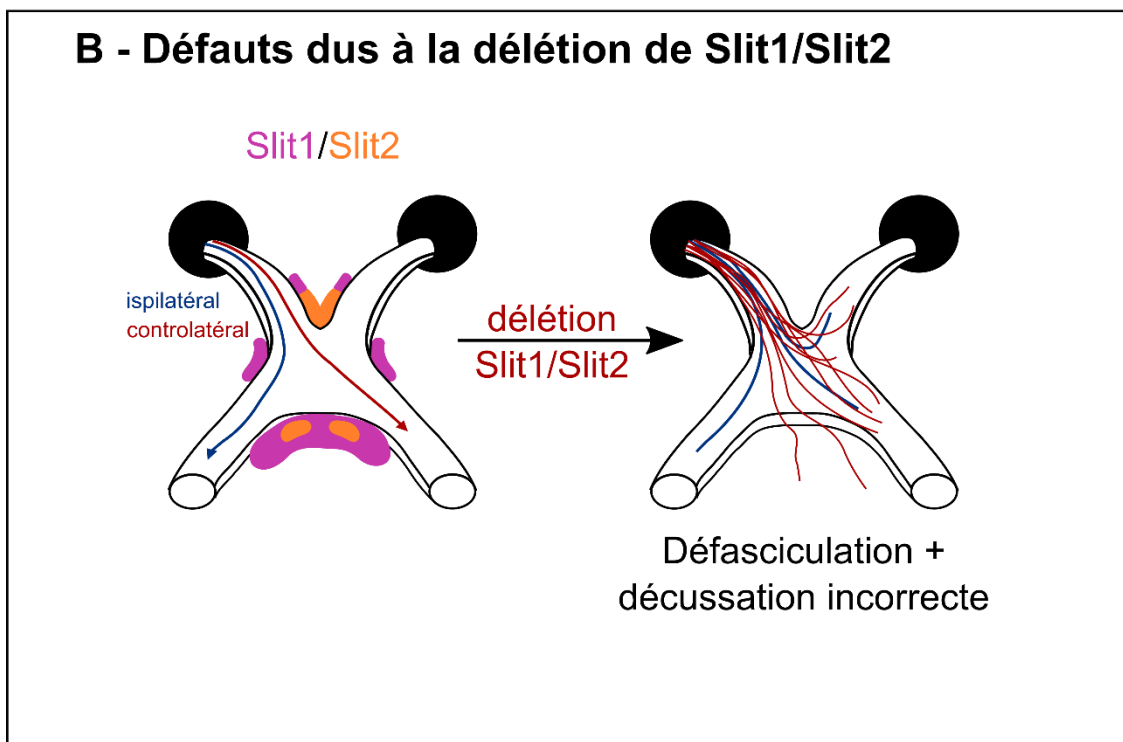
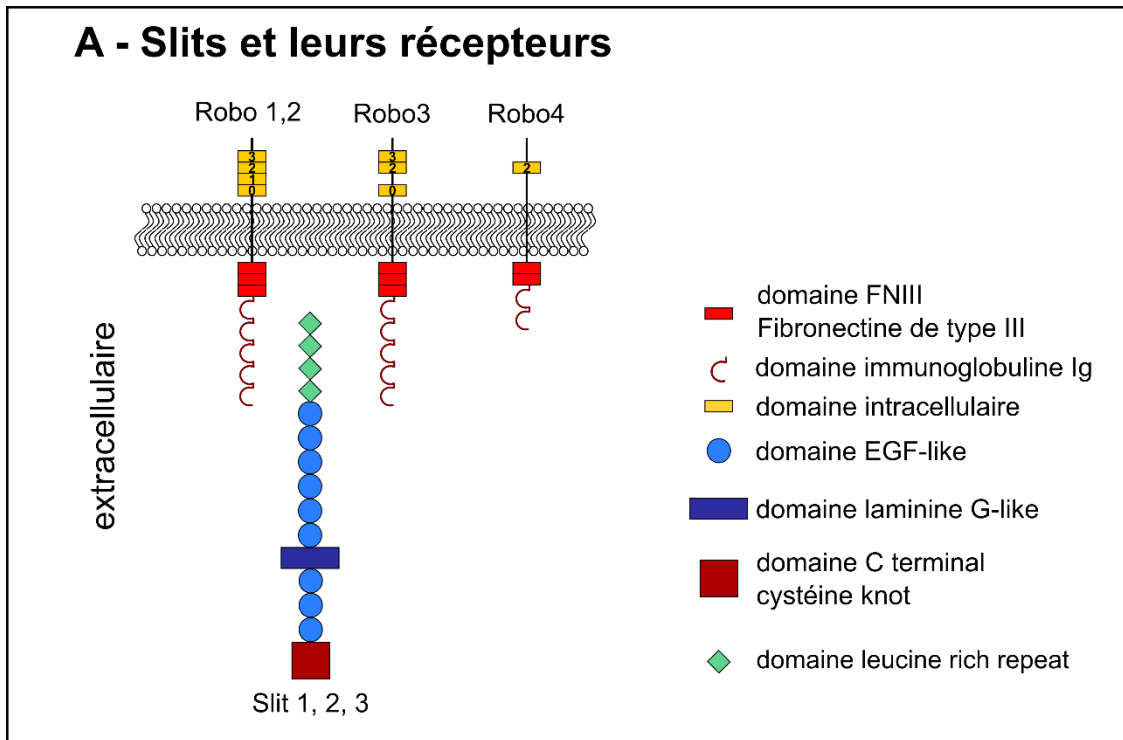


Figure 12 : Les Slits

(A) Structure des ligands Slit (1, 2 et 3) et de leurs récepteurs Robo (1, 2, 3 et 4). (B) Défauts de guidage observés suite à la délétion de Slit1/2.

Les ligands Slits eux-mêmes subissent des modifications. La protéine Slit entière (Slit-FL, « full length ») est clivée par des protéases résultant en deux fragments Slits : un long fragment correspondant à la partie N-terminale (Slit-N) et un court fragment, à la partie C-terminale (Slit-C). Il a été démontré que ce sont Slit-FL et Slit-N qui sont responsables des fonctions physiologiques. Le rôle de Slit-C reste vague, tout comme l'identité de la protéase responsable du clivage. Afin d'identifier cette dernière, des chercheurs ont réalisé un « screening » des ARNi dans les muscles de la drosophile. Par ce biais, un candidat intéressant a été mis en évidence : Amontillado (Amon), équivalent à l'homologue chez la drosophile de la convertase phéromone 2 (PC) (Ordan et Volk 2016). En effet, chez les drosophiles mutantes pour Amon, Slit n'était plus clivé. Cependant, la co-expression d'Ammon et Slit-FL ne modifie pas le clivage de Slit-FL mais induit un changement dans sa taille. Ces résultats suggèrent que l'effet d'Ammon sur Slit-FL est indirect et implique d'autres acteurs, participant aux modifications post-traductionnelles de Slit-FL. De manière intéressante, la PC participe à la régulation de plusieurs métalloprotéases. C'est pourquoi, la PC pourrait moduler le clivage de Slit via ces métalloprotéases, mais ceci n'est pas confirmé (Bassi, Mahloogi, et Klein-Szanto 2000).

Pendant longtemps, les chercheurs se sont focalisés surtout sur Slit-N et Slit-FL puisqu'ils sont impliqués dans l'interaction avec les récepteurs Robos et dans le guidage de nombreuses populations d'axones pendant le développement (Kidd, Bland, et Goodman 1999; Brose et al. 1999). Le rôle de Slit-C, quant à lui, reste méconnu. Récemment, en se focalisant sur la ligne médiane, Delloye-Bourgeois et ses collaborateurs ont mis en évidence que Slit-C interagissait avec PlexinA1 (indépendamment des neuropilines), plutôt qu'avec les Robo (Delloye-Bourgeois et al. 2015). Cette signalisation participe à empêcher les axones de retraverser la FP une fois arrivés de l'autre côté. Ensemble, les Slits et les Sémaphorines contrôlent la sortie des axones commissuraux de la FP.

Les Slits sont également impliqués dans le guidage axonal du système visuel au niveau du chiasma optique notamment. Ils permettent de contenir les axones dans les tractus optiques. La délétion de Slit1/Slit2 conduit à une défasciculation des axones et à une décussation incorrecte (Plump et al. 2002) (Figure 12-B).

En plus de médier le guidage axonal, la signalisation Slit/Robo permet le positionnement médio-latéral des projections longitudinales (Rajagopalan, Nicolas, et Dickson 2000; Simpson et al. 2000). En effet, plus un cône de croissance contient de récepteurs Robos, plus l'axone navigue latéralement (loin de la source de Slit).

La découverte de toutes ces molécules de guidage soulève de nombreuses questions. Comment toutes ces signalisations, qui sont exprimées de manière synchronisée dans le

temps et l'espace, sont-elles intégrées dans le cône de croissance afin d'assurer toutes ces trajectoires axonales ? La combinaison d'une nouvelle génération de fluorophores et de techniques de vidéo-microscopie commence à lever le voile sur les mécanismes subtils qui ont lieu au niveau du cône de croissance qui module sa réponse par rapport à son environnement. En effet, Pignata et ses collaborateurs (Pignata et al. 2019) ont utilisé l'embryon de poulet pour montrer que les récepteurs de guidage, permettant la sortie de la FP, sont triés de manière spécifique pendant la traversée de la ligne médiane. Pour cela, ils ont fusionné une protéine GFP sensible au pH (pHLuorin-GFP) avec Robo1, Robo2, Neuropilin2 et PlexinA1 et ont électroporé ces constructions dans la moelle épinière de poulet en cours de développement. En utilisant la vidéo-microscopie, ils ont pu suivre la dynamique de chaque molécule individuelle au sein d'un seul cône de croissance. Ils ont ainsi démontré que même si les récepteurs sont exprimés tous en même temps dans les axones et les cônes de croissance, leur trafic à la surface du cône de croissance est régulé finement dans le temps. Ils arrivent jusqu'à la membrane l'un après l'autre, permettant comme cela la modulation graduelle de la sensibilité du cône de croissance à son environnement.

V- Autres molécules associées au guidage et mécanismes de formation des circuits neuronaux

Au-delà des molécules de guidage classiques, il existe un grand nombre de mécanismes résultant en une activité de guidage axonal. Ils peuvent être divisés en forces chimiques et physiques qui permettront la construction des circuits neuronaux.

a- Les molécules d'adhésion

Les axones en cours de croissance font des contacts avec leur environnement au travers de molécules d'adhésion cellulaire. Ces molécules jouent un rôle dans le processus du guidage axonal. Parmi elles on trouve, les intégrines, les cadhérines et la superfamille des immunoglobulines (Ig). L1-CAM appartient à la famille des IgCAM et a été impliqué dans des fonctions de pousse et de guidage axonal. En effet, sa mutation est à l'origine du syndrome de l'hydrocéphalie liée à l'X qui se caractérise par un élargissement ventriculaire et une hypoplasie des principaux tractus axonaux (tractus corticospinal ou corpus callosum) suggérant le rôle de L1-CAM dans la croissance axonale et le guidage (Camp et al. 1993). La suppression de L1-CAM chez la souris résulte en les mêmes observations : défauts de guidage des axones du tractus corticospinal (Cohen et al. 1998). L1-CAM est capable de se lier au récepteur Neuropilin1 (appartenant au complexe de récepteur de Sema3A), ce faisant, L1-CAM transforme la répulsion en attraction axonale (Castellani et al. 2002). NCAM fait également partie de la superfamille des IgCAM et contrôle le guidage axonal par le biais du phénomène de fasciculation sélective observé pendant le développement (Rutishauser et al. 1978). La délétion de NCAM chez la souris induit une réduction du volume des bulbes olfactifs

due à une migration altérée des précurseurs des cellules granulaires olfactives (Cremer et al. 1994). Cette suppression conduit également à une fasciculation anormale et à des défauts de guidage lors des connexions intra-hippocampales (Cremer et al. 1997). D'autre part la molécule NrCAM participe aussi aux mécanismes de guidage en se liant à Neuropilin2 (faisant partie du complexe de récepteurs de Sema3B et Sema3F). De manière similaire à L1-CAM, il permet de convertir la répulsion exercée par Sema3B et Sema3F en attraction. NrCAM est nécessaire pour le phénomène de collapse présenté par les axones de la commissure antérieure, permettant le bon positionnement de ces projections (Falk et al. 2005). NrCAM participe également au guidage des axones des CGR générés tardivement au sein de la rétine ventrotemporale mais surtout au guidage des axones controlatéraux dans le système visuel (Williams et al. 2006).

b- Les morphogènes

Dans les mutants pour DCC ou Netrin, des axones sont toujours capables d'atteindre la ligne médiane et de la traverser avec succès. Il se peut donc que d'autres molécules aient une activité attractive redondante. Des molécules telles que les morphogènes ou les facteurs de croissance semblent avoir une activité de guidage. Par exemple, Shh (Sonic hedgehog) est spécifiquement exprimé par les CGR controlatérales et est transporté jusqu'au chiasma optique pour repousser les axones ipsilatéraux et les empêcher de traverser la ligne médiane (Peng et al. 2018). Shh contrôle le guidage axonal à travers la ligne médiane grâce à son interaction avec son récepteur Boc, une protéine associée à Robo (Fabre, Shimogori, et Charron 2010). Ainsi, Shh module le guidage axonal par différents biais : il donne son identité à un tissu puisqu'il s'agit d'un morphogène, il régule la sensibilité des axones à d'autres molécules de guidage répulsives (Parra et Zou 2010) et il a lui-même une activité de guidage (Peng et al. 2018).

Parmi les morphogènes étudiés pour leur rôle dans le guidage axonal, on trouve également Wnt. Chez la drosophile, il a été montré que Wnt5 contrôle le guidage des axones provenant de la commissure antérieure, en les empêchant d'envahir la commissure postérieure. Pour cela, Wnt5 interagit avec Derailed, un récepteur à activité tyrosine kinase (Yoshikawa et al. 2003). Chez les mammifères, Wnt contrôle la trajectoire antérieure-postérieure des axones commissuraux au moment de la traversée de la FP (Lyuksyutova et al. 2003). Par exemple, Wnt4 est exprimé sous une forme de gradient décroissant de l'avant vers l'arrière.

De manière intéressante, Shh et Wnt dialoguent pour contrôler le devenir des axones au moment de la traversée de la ligne médiane (Onishi et Zou 2017). Dans les neurones commissuraux n'exprimant plus Smo (Smothernened), un récepteur de Shh, on observe une augmentation de l'expression de Shisa2, un homologue d'inhibiteur de Wnt. Shisa2 interagit avec Fzd3 et retient ce dernier dans le réticulum endoplasmique. Ainsi, Shisa2 contrôle la

glycosylation de Fzd3 et son trafic vers la surface du cône de croissance, modulant de ce fait la sensibilité à Wnt. Lorsque Shisa2 est surexprimé, les axones commissuraux tournent de manière aléatoire dans l'axe antéro-postérieur après la traversée de la ligne médiane. Au contraire, l'inhibition de Shisa2 induit une expression prématurée de Fzd3 et entraîne ainsi une réponse prématurée des axones commissuraux qui tournent rostralement avant d'avoir traversé la FP : ces axones ne traversent donc plus la ligne médiane.

Ces études mettent en lumière qu'une signalisation moléculaire donnée ne régule pas qu'un événement unique (par exemple, Shh qui attire les axones à la ligne médiane) mais plusieurs étapes de la navigation axonale (Wnt contrôle l'orientation antéro-postérieure des axones commissuraux au moment de la traversée) en modulant d'autres familles de ligands/récepteurs.

c- Les protéoglycanes

Récemment, des molécules autres que des protéines ont été impliquées dans le guidage axonal. En effet, les sucres et les lipides ont été décrits comme participant au cheminement des axones (Guy et Kamiguchi 2021).

Les protéoglycanes (PG) sont des macromolécules qui appartiennent à la matrice extracellulaire et qui sont potentiellement présents à la surface de toutes les cellules. Ces glycoprotéines sont formées d'un cœur de protéine lié à une ou plusieurs (jusqu'à plus de 100) chaînes de glycosaminoglycanes (GAG). Les GAG sont essentiels au fonctionnement des PG : lorsqu'ils sont délétés, cela endommage les fonctions des PG. De plus, les PG sont grandement modifiés par des sulfonations et des épimérisations. La chondroïtine sulfate (CS) et l'héparane sulfate (HS) façonnent le système nerveux au cours du développement, mais ils jouent aussi un rôle essentiel dans le système nerveux mature lésé. L'expression de HS dans le système visuel a été décrite dans le début des années 90 (Halfter 1993). La modulation génétique ou biochimique de HS a révélé son rôle critique dans tout le système nerveux (Walz et al. 1997; Inatani et al. 2003) : il module la réponse des axones aux molécules de guidage classiques. Par exemple, la délétion spécifique de EXT1 (une enzyme contrôlant la formation des GAG de HS) dans la rétine, conduit au même phénotype qu'une délétion de Netrin (Ogata-Iwao et al. 2011). L'HS peut également se lier aux Slits (Ronca et al. 2001) et contribuer au guidage axonal des CGR (Inatani et al. 2003). Il a été aussi démontré que l'HS pourrait protéger les molécules de guidage de la dégradation ou pourrait contrôler leur concentration locale en restreignant leur diffusion (Yu, Pearson, et Geller 2018). Les CS, quant à elles, sont régulées dans le temps et l'espace dans la rétine en cours de développement (Brittis, Canning, et Silver 1992). Dans des préparations de cerveaux de Xénope, l'ajout de CS exogène perturbe fortement la trajectoire des projections retino-tectales (Walz et al. 2002). La manipulation des CS directement *in vivo* par l'injection de chondroïtinases ABC conduit

également à des défauts de guidage des axones des CGR (Ichijo et Kawabata 2001). Tous ces phénotypes suggèrent fortement que les CS agissent comme des facteurs de guidage répulsifs. Cependant, leur mécanisme d'action reste encore flou. Comme pour l'HS, les CS dialoguent avec les molécules de guidage classiques telles que Sema3A. Dans des cellules N2A en culture, la chondroïtinase ABC permet le relargage de molécules de guidage depuis la surface cellulaire, reflétant la communication entre les CS et les facteurs de guidage (De Wit et al. 2005).

Les PG interagissent avec de nombreux récepteurs et partenaires (Yu, Pearson, et Geller 2018). Les CS et les HS se lient principalement à deux familles de récepteurs : le récepteur de type IIa à activité tyrosine kinase (RPTPgamma, RPTP sigma et LAR) et les récepteurs Nogo (NgR1 et NgR2). Toutes ces interactions conduisent à une répulsion des axones dans le contexte de la régénération (Yu, Pearson, et Geller 2018; Shen et al. 2009).

d- Les lipides

Puisque les lipides sont impliqués dans différents processus cellulaires clés, on peut se questionner sur leur rôle dans le guidage axonal. Différents lipides ont, en effet, été associés au phénomène de guidage, tels que l'anandamide cannabinoïde (Berghuis et al. 2007) ou les lysolipides comme la Sphingosine 1-phosphate (S1P) (Strochlic et al. 2008), le lysophosphatidylglucoside (Guy et al. 2015) ou l'acide lysophosphatidique (Cheng et al. 2016). Les lysolipides sont obtenus après l'action des phospholipases A1 et A2 (PLA1 et PLA2) qui hydrolysent les membranes des phospholipides. Mais les phospholipides peuvent également être obtenus différemment. En effet, la sphingosine est un dérivé de la céramide (Maceyka et al. 2012) : S1P est libéré dans le cytosol après la phosphorylation de la sphingosine par une isoenzyme kinase de la sphingosine. S1P est ensuite transporté à la surface cellulaire. Aujourd'hui, on décrit 5 S1P : S1P1 à S1P5.

Au cours du développement du système visuel chez le Xénope, S1P induit une réponse répulsive forte de la part des cônes de croissance (Strochlic et al. 2008). De plus, la modulation de S1P *in vivo* conduit à des défauts de navigation axonale. Les récepteurs des S1P sont vaguement décrits : S1P agit à travers des GPCR (G-protein coupled receptors) tels que EDG-1 (Lee et al. 1998). Aujourd'hui, on dénombre 5 GPCR se liant à S1P. Leur mécanisme d'action est d'autant plus complexe que les S1P agissent de concert avec les HS.

L'implication des lipides dans le guidage axonal met en avant l'incroyable complexité de régulation de ce phénomène.

e- Forces physiques

Les forces physiques telles que la tension, la rigidité des tissus ou l'activité électrique sont autant de mécanismes peu étudiés qui modulent le guidage axonal. Au cours de la croissance

axonale, les cônes de croissance et les axones doivent interagir physiquement avec leur environnement. De plus, l'orientation des cônes de croissance va impliquer des forces mécaniques différentes sur le cytosquelette (Athamneh et Suter 2015). Se pose alors la question de l'importance du support des axones en cours de croissance. C'est pourquoi, des études se sont focalisées sur le comportement axonal sur différents substrats à différentes rigidités. Lorsque la rigidité du substrat est modifiée, les axones ont leur potentiel de croissance qui change. Ce phénomène est dû à la dynamique du cytosquelette, notamment au flux rétrograde d'actine (Chan et al. 2008). Un système d'embrayage-moléculaire a été évoqué pour décrire l'interaction physique des cellules avec leur environnement. Ceci signifie que les cellules utilisent un embrayage moléculaire pour lier leur F-actine au substrat et contrôlent donc le taux de polymérisation de la F-actine pour créer des forces afin de pousser le cône de croissance dans une direction donnée (Hu et al. 2007). Chan et ses collaborateurs ont mis en évidence que la rigidité du substrat influençait ce processus et que la dynamique de la F-actine est adaptée selon l'environnement neuronal (Hu et al. 2007). La plupart de ces études ont été réalisées *in vitro* : peu de données *in vivo* sont disponibles. Récemment, Thompson et ses collègues (Thompson et al. 2019) se sont demandés si ces régulations avaient également lieu *in vivo*. Ils ont, pour cela, utilisé la microscopie de force atomique sur des tissus de Xénope en cours de développement. Ils ont ainsi montré qu'il existe un gradient de rigidité du tissu *in vivo* : les axones ont tendance à suivre ce gradient. En effet, les axones des CGR poussent plutôt en direction des tissus les plus mous. Il semble donc que les axones soient mécano-sensitifs : lorsque la rigidité du tissu ou la mécano-sensitivité des neurones sont altérées, le guidage axonal est grandement impacté (Koser et al. 2016). La rigidité du tissu est un processus dynamique qui peut se modifier en quelques minutes. Elle est due à la prolifération cellulaire : quand cette dernière est modifiée, on observe des défauts de guidage (Thompson et al. 2019).

Ces forces physiques n'expliquent pas tous les phénomènes. En effet, même si l'actine est dépolymérisée (Kunda et al. 2001) ou que la myosine II est inhibée (Dupraz et al. 2019), dans des cultures en 2D, les axones continuent de pousser. Récemment, Santos et ses collaborateurs (Santos et al. 2020) ont précisé le phénomène d'embrayage-moléculaire. Ils ont mis en culture des neurones d'hippocampe embryonnaires dans une matrice 3D de collagène pour se rapprocher des paramètres physiologiques. En utilisant une combinaison de modulations du cytosquelette, de microscopie à super-résolution, d'imagerie en direct et de microscopie à force atomique, ils ont mis en évidence la dynamique du cytosquelette et sa régulation pendant la pousse axonale. Ils ont ainsi pu découvrir que ce processus d'interaction entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire n'est pas si trivial pour expliquer la

croissance axonale. En effet, l'adhésion semble facultative pour la croissance des axones dans une matrice 3D (Lämmermann et Sixt 2009).

Enfin, une autre force pourrait réguler le guidage et la croissance des axones : l'électricité. Ce processus est appelé galvanotropisme. Des études *in vitro* ont montré que les axones des CGR poussent vers la cathode lorsqu'ils sont soumis à un champ électrique (Yamashita 2015). *In vivo*, un gradient de voltage extracellulaire a été mis en évidence dans la rétine en développement (Yamashita 2013). Les axones des CGR semblent être sensibles à ce champ électrique qui est important pour définir l'orientation initiale des axones. Les mécanismes détaillés du galvanotropisme restent encore flous.

VI- Les molécules de guidage dans la formation du système visuel

Les molécules de guidage permettent de guider les axones en cours de croissance à travers de longues distances pour qu'ils puissent connecter leur cible correcte dans le corps. Dans le système visuel, les axones des CGR sont les seuls prolongements qui forment le nerf optique, permettant ainsi la connexion entre la rétine et le cerveau. Ce trajet est finement régulé par l'expression des facteurs de guidage : en voici la feuille de route (Erskine et Herrera 2014) (Figure 13).

a - Guidage dans l'œil

Les CGR se différencient chez l'embryon à partir de E11 et envoient ensuite leur axone dans la couche des fibres optiques située à la surface de la rétine. Les axones poussent en direction de la sortie de l'œil correspondant au disque optique, qui débouche sur le nerf optique (Figure 13-A). Slit1 et Slit2 participent ici au maintien des axones dans la couche des fibres optiques, les empêchant d'aller dans des couches plus externes (Niclou, Jia, et Raper 2000). Chez des souris mutantes pour Slit1 et Slit2, les axones des CGR projettent dans les autres couches de manière aberrante et se dirigent vers la périphérie de la rétine (en direction opposée du disque optique) (Thompson et al. 2006). En effet, Slit2 est également exprimé par le cristallin pour empêcher les axones de naviguer vers la périphérie. Les CSPG sont également exprimés sur cette périphérie et participent à la même régulation que les Slits (Brittis, Canning, et Silver 1992). Les protéines Sfrp1 et Sfrp2 (Secreted Frizzled Related Proteins) contraignent la pousse des axones des CGR dans la couche fibreuse de la rétine et jusqu'au niveau du disque optique (Marcos et al. 2015). Shh, quant à lui, est exprimé en gradient de la périphérie vers le disque optique, permettant d'attirer les axones vers la sortie de la rétine (Sánchez-Camacho et Bovolenta 2008). Des molécules d'adhésion telles que L1-CAM aident les axones à pousser vers le centre de la rétine pour ensuite former le nerf optique (Brittis, Canning, et Silver 1992). Afin de sortir de l'œil, Netrin-1 est exprimée au niveau des cellules gliales du disque optique :

les axones des CGR possèdent le récepteur DCC et sont ainsi attirés vers la sortie de l'œil (Deiner et al. 1997). Chez les souris mutantes pour DCC ou pour Netrin-1, les axones naviguent jusqu'au nerf optique mais ne parviennent pas à en sortir, provoquant une hypoplasie du nerf optique (Vigouroux et al. 2020). NrCAM est également impliqué dans la navigation des axones vers le disque optique. Sa suppression induit une navigation des axones des CGR à travers toute la rétine, jusqu'au côté opposé, ils ne s'arrêtent plus au niveau de la sortie de l'œil (Zelina et al. 2005). Au niveau du disque optique, la laminine-1 est exprimée : en interagissant avec Netrin, elle transforme son effet attractif en répulsion, ainsi les axones se dirigent plus profondément dans le disque optique, là où seulement Netrin est présente (Höpker et al. 1999).

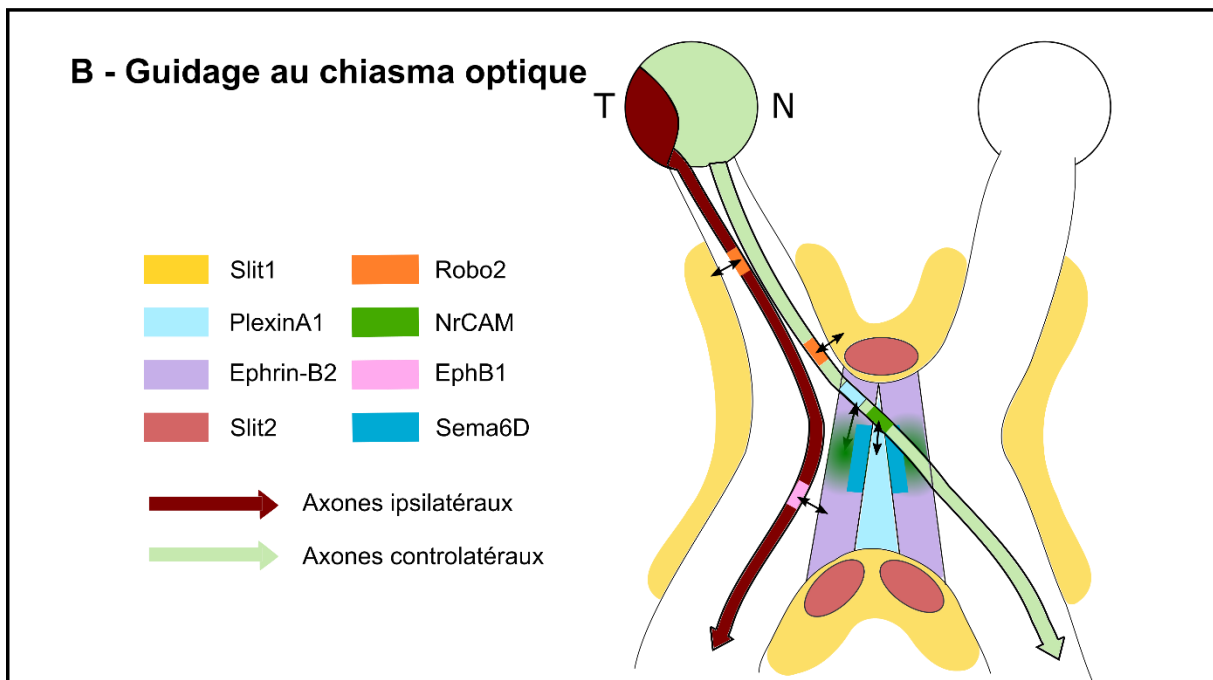
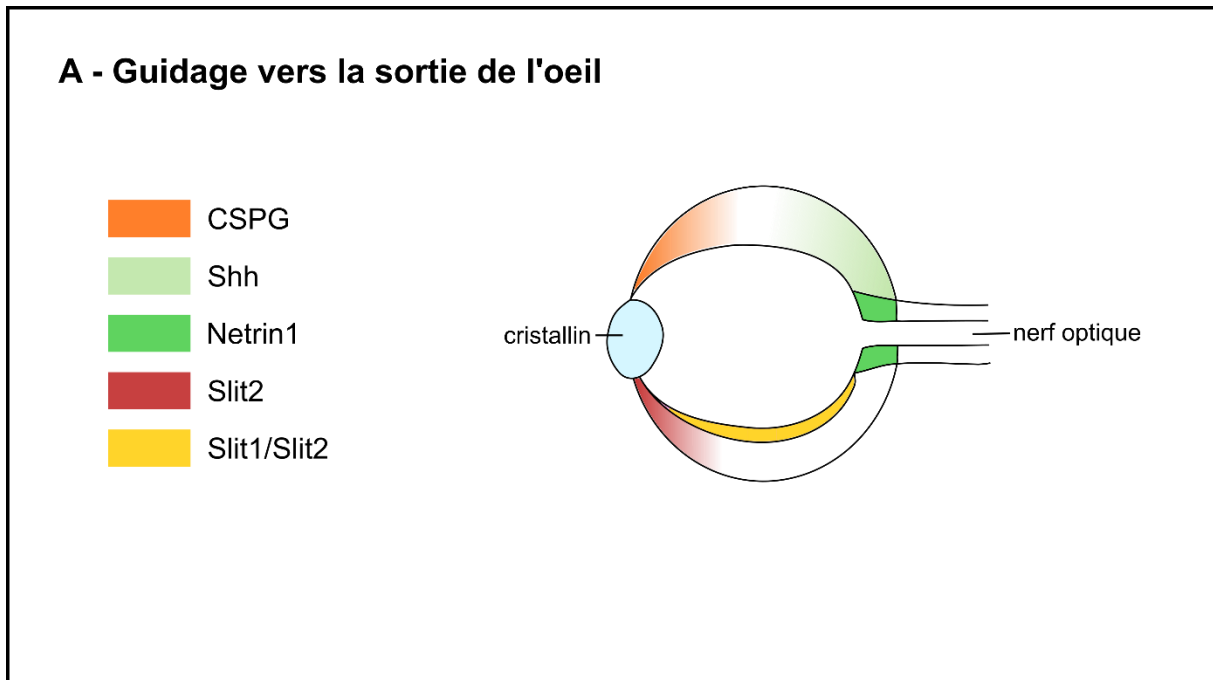


Figure 13 : Guidage dans le système visuel

(A) Représentation schématique des molécules de guidage exprimées dans l'œil au cours du développement pour permettre aux axones des cellules ganglionnaires de se diriger vers le disque optique (au centre de la rétine) et d'ainsi pouvoir sortir de l'œil. (B) Représentation schématique des molécules de guidage exprimées le long des nerfs optiques, des tractus optiques et au niveau du chiasma optique afin de guider les axones au bon endroit. Les Slits restreignent les axones, qui expriment le récepteur Robo2, aux conduits optiques (nerfs et tractus). PlexinA1, en interagissant avec NrCAM présent sur les axones controlatéraux, attirent ces derniers au niveau du chiasma optique, permettant leur traversée. L'interaction entre PlexinA1 et NrCAM, exprimés par les CGR controlatéraux, avec le complexe NrCAM-Sema6D-PlexinA1 au niveau du chiasma promeut la traversée de la ligne médiane. Enfin, les axones ipsilatéraux expriment EphB1 et sont donc repoussés de la ligne médiane par EphrinB2. Adapté de **Connecting the retina to the brain, Erskine & Herrera, 2014, ASN Neuro**

b - Guidage au chiasma optique

Une fois que les axones des CGR sont sortis de l'œil, ils sont contenus dans un espace restreint pour former le nerf optique. Sema5A et Slit2 sont exprimés par les cellules gliales avoisinantes et permettent, via leur action répulsive, de compacter tous les axones dans un faisceau (Plump et al. 2002; Oster et al. 2003). Les axones des CGR poussent ensuite jusqu'au chiasma optique constitué du croisement des deux nerfs optiques : là, a lieu la décussation, c'est-à-dire que les axones ipsilatéraux vont projeter vers l'hémisphère cérébral du même côté, et les axones controlatéraux vont projeter dans l'autre hémisphère (Figure 13-B). Chronologiquement, les axones ipsilatéraux, provenant de la partie ventro-temporale de la rétine, atteignent le chiasma optique à E12, ce sont des axones pionniers qui serviront ensuite de « rails » aux axones suivants (Soares et Mason 2015). Ils expriment grandement le récepteur EphB1, qui, en interagissant avec son ligand EphrinB2 exprimé par les cellules gliales de la ligne médiane, induit une répulsion empêchant la traversée des axones ipsilatéraux (Williams et al. 2003). L'expression de EphB1 dans les CGR est contrôlée par le facteur de transcription Zic2 (« Zinc finger transcription factor ») (García-Frigola et al. 2008), marqueur spécifique des axones ipsilatéraux. De plus, le facteur de transcription Zic2 éteint la signalisation Wnt5a dans les axones ipsilatéraux les empêchant de traverser la ligne médiane (Morenilla-Palao et al. 2020). D'autres facteurs répulsifs tels que Shh empêchent les axones ipsilatéraux de traverser la ligne médiane (Sánchez-Camacho et Bovolenta 2008).

Entre E14 et E16, la plupart des axones ipsilatéraux et controlatéraux des CGR sont envoyés vers le chiasma optique. Les CGR localisées dans toute la rétine excepté dans la partie ventro-temporale verront leur axone traverser la ligne médiane : ce sont les axones controlatéraux. Ces derniers expriment spécifiquement la molécule d'adhésion cellulaire NrCAM. Lorsque NrCAM est délétée, on observe une augmentation du nombre d'axones ipsilatéraux (Williams et al. 2006). De plus, l'absence de NrCAM affecte particulièrement les axones controlatéraux tardifs (générés vers E17 dans la rétine ventro-temporale), suggérant un rôle primordial de NrCAM dans la traversée des axones provenant des CGR controlatéraux spécifiquement (Williams et al. 2006). NrCAM est également exprimée par les cellules gliales au niveau de la ligne médiane afin de permettre l'attraction et la traversée des axones controlatéraux.

En effet, il semblerait que NrCAM se lie avec Sema6D, exprimés tous deux par les cellules gliales de la ligne médiane, pour interagir avec PlexinA1 exprimée par les cellules bordant le chiasma postérieur. L'interaction entre PlexinA1 et NrCAM, exprimés par les CGR controlatéraux, avec le complexe NrCAM-Sema6D-PlexinA1 au niveau du chiasma conduit à une réponse promotrice de la pousse et à une traversée de la ligne médiane. En effet, cette combinaison transforme l'action inhibitrice sur la pousse des axones de Sema6D en une promotion de la pousse (Kuwajima et al. 2012). Les axones controlatéraux sont également

attirés par VEGF-A (« Vascular Endothelial Growth Factor A »), présent à la ligne médiane, dont les CGR possèdent le récepteur Neuropilin1 (Erskine et al. 2011). Les axones controlatéraux expriment également la protéine Wnt5a qui participe à leur traversée de la ligne médiane (Morenilla-Palao et al. 2020).

Enfin, la présence de molécules de guidage répulsives telles que Slit1 et Slit2 autour du chiasma permet de contenir tous les axones, les empêchant de projeter ailleurs dans le cerveau. En effet, en leur absence, les axones naviguent dans de mauvaises directions et n'effectuent pas de décussation correcte (Plump et al. 2002; Fricke et al. 2001; Plachez et al. 2008).

De plus, des molécules d'adhésion telles que DSCAM permettent l'extension et la fasciculation des axones des CGR mais aussi leur navigation au-delà du chiasma optique, vers leurs cibles. En effet, la mutation de DSCAM altère la trajectoire des axones après leur passage au niveau du chiasma optique et retarde donc l'innervation des cibles plus distales (Bruce et al. 2017).

Ensuite, les axones poursuivent leur route via les tractus optiques pour connecter leurs cibles cérébrales correctes.

c - Guidage vers les cibles cérébrales

1- Vers le noyau suprachiasmatique

La première cible que les axones des CGR rencontrent est le noyau suprachiasmatique (NSC). Comme décrit précédemment, ce noyau est innervé spécifiquement par les CGRip sensibles à la lumière. A partir de E15 les axones des CGRip avancent vers le chiasma optique et l'atteignent à E17, ils innervent ensuite le NSC à partir de P0 (McNeill et al. 2011). Le NSC ne devient mature que quelques semaines plus tard, notamment après avoir reçu des informations lumineuses, c'est-à-dire à partir de l'ouverture des yeux à P12-P14. Les CGRip innervent d'abord la partie ventrale du NSC de manière ipsilatérale. Ensuite, les axones controlatéraux innervent le NSC. Le NSC est le seul noyau recevant 50% des afférences de chaque œil. En effet, certains axones controlatéraux sont capables de former des branches collatérales qui permettent d'innover le NSC ipsilatéral en même temps (Fernandez et al. 2016). Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'innervation du NSC restent à ce jour méconnus.

2- Vers le corps genouillé latéral dorsal

Le corps genouillé latéral dorsal (ou dLGN) forme un relais entre la rétine et le cortex visuel. Les axones controlatéraux innervent en premier le dLGN à partir de E16 (Godement, Salaün, et Imbert 1984). Les axones ipsilatéraux ne le connectent que plus tard, à partir de E18. Dans les premiers temps de l'innervation du dLGN, les axones ipsi- et controlatéraux innervent les mêmes régions. Une étape de ségrégation a ensuite lieu à partir de P4 et se termine après

l'ouverture des yeux (Jaubert-Miazza et al. 2005). Le rôle des molécules de guidage durant l'innervation du dLGN reste vague. Cependant, leur rôle dans la ségrégation des axones commence à être décrit. Les projections des axones dans le dLGN se font de manière organisée selon la carte œil-spécifique. Ainsi, des chercheurs ont décrit que le dLGN exprimait les ligands EphrinA2 et EphrinA5 en gradient. De la même manière, les CGR expriment les récepteurs EphA5 et EphA6 sous forme de gradient (Pfeiffenberger et al. 2005). De plus, chez les souris déficientes pour EphrinA2, A3 ou A5, la ségrégation ne se déroule pas correctement.

Cependant, les chercheurs ont démontré que les cartes rétinotopiques ne dépendent pas seulement du guidage axonal. En effet, une fois que les axones connectent leur cible, la synaptogénèse et le raffinement des circuits permet un élagage et une bonne mise en place des circuits neuronaux (Pfeiffenberger et al. 2005).

3- Vers le colliculus supérieur (ou superior colliculus – SCol)

Le colliculus supérieur (SCol) est la cible la plus distale que connectent les axones des CGR. De manière similaire au dLGN, les facteurs de guidage agissant au sein du SCol sont principalement impliqués dans la ségrégation des projections plutôt que dans le guidage lors de l'innervation (ces mécanismes restent encore flous). Les axones controlatéraux innervent le SCol à partir de E16 alors que les axones ipsilatéraux ne commencent à le connecter qu'après la naissance (Godement, Salaün, et Imbert 1984). Dans un premier temps, les projections ipsilatérales recouvrent les connexions controlatérales. Après l'ouverture des yeux, une ségrégation a lieu, permettant aux axones ipsilatéraux de se restreindre dans la zone inférieure de la couche optique (H. H. Wu, Cork, et Mize 2000). Les molécules de guidage participent donc à la formation des cartes rétinotopiques dans le SCol. Parmi elles, on trouve les EphrinA2 et A5 qui sont exprimées au niveau du SCol postérieur (Feldheim et al. 2004). Les axones des CGR temporaux expriment les récepteurs EphA5 et EphA6 et vont donc projeter dans le SCol antérieur. Lorsque EphrinA5 est déplétée, les axones temporaux présentent des défauts de guidage et projettent dans le SCol postérieur. Les EphrinB gouvernent le guidage au sein de l'axe dorso-ventral. Les CGR expriment les récepteurs EphB1 et EphB2 selon un gradient ventro-dorsal (du plus au moins exprimé). On trouve le gradient inverse dans le SCol : les ligands EphrinB1 et EphrinB2 sont exprimés selon un gradient médio-latéral (du plus au moins exprimé). Mais de manière surprenante, les axones des CGR ventraux exprimant fortement les récepteurs Eph connectent le SCol médial qui est enrichi en ligands Ephrines (Hindges et al. 2002). Ce phénomène suggère que les Ephrines peuvent avoir un effet attractif, mais ces mécanismes restent inconnus. La protéine DCC participe également à la mise en place des cartes rétinotopiques dans le SCol. En effet, chez les mutants DCC, on observe une extension du territoire occupé par les projections ipsilatérales, suggérant un défaut de raffinement (Vigouroux et al. 2020). D'autres molécules

de guidage sont également impliquées dans la rétinotopie du SCol, c'est le cas des molécules d'adhésion cellulaire. Parmi elles, on trouve L1-CAM, qui lorsqu'il est supprimé, induit une modification de la topographie des axones dans le SCol (innervation de la partie postérieure plutôt que de la partie antérieure du SCol) ([Demyanenko et Maness 2003](#)). ALCAM (Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule) est exprimée dans le SCol au cours de la croissance des CGR en direction du SCol. ALCAM interagit avec L1CAM présent sur les axones des CGR pour permettre le positionnement correct des axones des CGR dans le SCol. En effet, en l'absence d'ALCAM, les axones provenant des CGR de la rétine temporale projettent anormalement dans la partie latérale du SCol controlatéral ([Buhusi et al. 2009](#)). NrCAM est également impliquée dans la localisation des axones des CGR dans le SCol. La délétion de NrCAM induit l'innervation de la partie latérale du SCol (au lieu de cibler le centre du noyau) ([Dai et al. 2013](#)).

Ainsi, la mise en place et la spécificité des circuits neuronaux sont assurées par de nombreuses molécules de guidage. Leur composition est spécifique pour chaque cible du système visuel et leur régulation spatiale et temporelle précise permet aux axones d'être acheminés correctement jusqu'à leurs cibles intermédiaires et finales.

Cette chorégraphie orchestrée par les molécules de guidage semble être la clé pour pouvoir permettre aux axones en cours de régénération de reformer un circuit nerveux fonctionnel. C'est pourquoi, le guidage est un processus essentiel à comprendre et à moduler dans le système nerveux adulte : ceci constitue mon projet de thèse.

Chapitre 3 : Le guidage axonal dans le système nerveux mature

Comme décrit dans le chapitre précédent, le guidage est un processus biologique qui contrôle le mouvement directionnel d'une cellule. Il est régulé par l'expression de facteurs de guidage dans l'environnement, qui peuvent être attractifs ou répulsifs et agir à courte ou longue distance. Ces molécules de guidage ont été décrites dans le système nerveux en cours de développement comme les facteurs extracellulaires qui contrôlent la navigation des axones jusqu'à leurs cibles (Tessier-Lavigne et Goodman 1996). Cependant, leur expression est associée avec d'autres mécanismes tels que la migration et la signalisation cellulaires et elle persiste tout au long de la vie pour réguler des systèmes physiologiques. Il est aujourd'hui admis que les molécules de guidage participent à la pathogénie de certains troubles neurologiques mais aussi de maladies cardiovasculaires, immunitaires et des cancers. Néanmoins, leur rôle doit être mieux mis en évidence pour savoir si et comment les molécules de guidage pourraient être considérées comme des cibles thérapeutiques. Enfin, il faut prendre en considération les rôles « physiologiques » et « pathologiques » de ces facteurs chez l'adulte afin de les intégrer dans les stratégies de régénération et permettre la reconstruction des circuits nerveux.

I- Rôles physiologiques du guidage axonal chez l'adulte

a- Guidage axonal répulsif dans le système nerveux central adulte

Concernant la navigation axonale, certaines molécules de guidage reproduisent leur rôle développemental chez l'adulte. Les lésions du SNC sont suivies d'une surexpression de molécules de guidage répulsives qui sont en partie responsable de l'incapacité de régénération (Figure 14). Par exemple, le couple ligand récepteur Wnt/Ryk conserve son rôle répulsif chez l'adulte. Le récepteur Ryk est exprimé par les axones du tractus corticospinal (CST) et relaie l'activité répulsive de Wnt-1 et Wnt-5a qui sont exprimés sous forme de gradient antéro-postérieur dans la moelle épinière en cours de développement (Liu et al. 2005). Suite à une lésion de la moelle épinière, Wnt-1 et Wnt-5a sont exprimés et exercent une activité répulsive sur les axones du CST lésés (Liu et al. 2008). L'utilisation d'anticorps anti-Ryk permet de réduire la rétraction des axones du CST et augmente leur bourgeonnement (« sprouting ») (Liu et al. 2008).

Le couple EphrinB3/EphA4 conserve également son action répulsive observée lors du guidage embryonnaire, dans la moelle épinière adulte. Au cours du développement, les axones du CST ne peuvent pas retraverser la ligne médiane à cause de la liaison de EphrinB3 sur leurs récepteurs EphA4 (Kullander et al. 2001; Yokoyama et al. 2001). Après la lésion de la moelle épinière, EphrinB3 repousse les fibres du CST exprimant EphA4 (Duffy et al. 2012).

L'utilisation d'un peptide bloquant EphA4 (Fabes et al. 2007) permet l'augmentation de la repousse des axones du CST probablement en désensibilisant les cônes de croissance à l'action répulsive d'EphrinB3, exprimée par les oligodendrocytes, et d'Ephrin-B2, exprimée par les astrocytes réactifs (Bundesen et al. 2003; Benson et al. 2005; Fabes et al. 2006).

Les molécules de guidage répulsives a (RGMa) sont des glycoprotéines qui inhibent la pousse neuritique en se liant au récepteur de Netrin-1, la Néogénine, présente sur les cônes de croissance. La répulsion de RGMa sur les axones en cours de navigation est impliquée dans le câblage du cortex pendant le développement (Brinks et al. 2004). Après une lésion de la moelle épinière chez l'adulte, RGMa est exprimée par la microglie activée (Kitayama et al. 2011) et a été récemment impliquée dans la réponse astrogliale via la signalisation TGFβ1/Smad2/3 (Zhang et al. 2018). Des anticorps dirigés contre les RGMa améliorent la régénération et la réparation nerveuse après une lésion de la moelle épinière (Mothe et al. 2017).

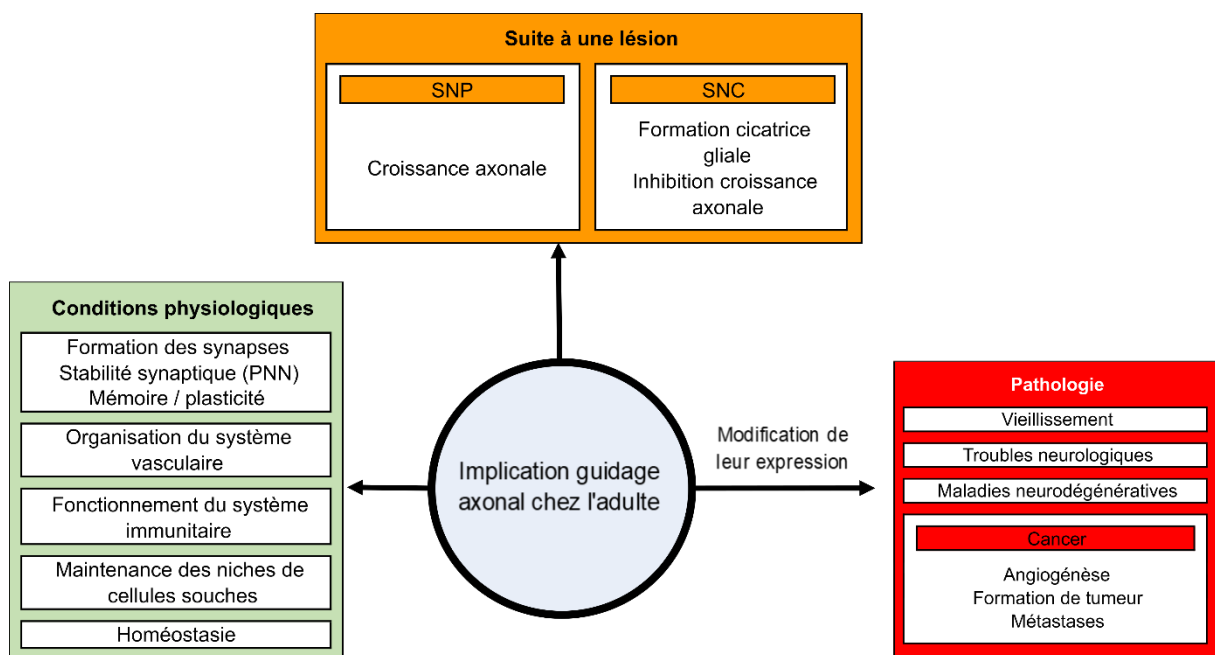


Figure 14 : Rôles des molécules de guidage chez l'adulte.

Les molécules de guidage peuvent avoir des rôles physiologiques chez l'adulte (vert). Elles participent à la réaction des systèmes nerveux (central et périphérique) suite à une lésion (orange). Enfin, une modification de leur expression chez l'adulte est source de modifications profondes telles que le vieillissement ou le développement de troubles, de maladies et de cancers.

Un autre exemple est la molécule Sema3A qui a une forte activité répulsive *in vitro*, pendant le développement et chez l'adulte (Kolodkin et al. 1997; Luo, Raible, et Raper 1993; Tang 2004). Son expression augmente dans les fibroblastes après la formation de la cicatrice gliale dans la moelle épinière lésée (Pasterkamp et al. 1999). L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de Sema3A sur le site de lésion de la moelle épinière permet une régénération des axones du CST et une reconnexion fonctionnelle (Kaneko et al. 2006; Zhang et al. 2014): ceci prouvant son activité répulsive dans la moelle lésée. Cependant, les neurones embryonnaires et adultes ne répondent pas forcément de la même façon à Sema3A. En effet, l'ajout de Sema3A sur des neurones de DRG *in vitro* et sur une cornée lésée *in vivo* promeut la pousse neuronale (Zhang et al. 2018). Ceci soulève des questions sur le fait que (i) différents récepteurs et complexes de récepteurs peuvent être impliqués dans la transduction du signal de guidage pendant le développement et chez l'adulte et que (ii) l'activité d'une molécule de guidage peut être modulée par son environnement (localisation et timing) et particulièrement par d'autres facteurs coexprimés.

b- Inhibition de croissance plutôt que répulsion

A la suite d'une lésion du SNC, les axones ne parviennent pas à régénérer à cause de leur incapacité de repousse intrinsèque et de leur environnement inhibiteur à la repousse (Silver et Miller 2004; Yiu et He 2006; He et Jin 2016). Les facteurs de guidage répulsifs exprimés ou surexprimés dans le SNC créent une barrière chimique pour les axones en cours de régénération, au niveau du site de la lésion (Figure 14). En particulier, les protéoglycanes CSPG sont rapidement produits par les astrocytes réactifs suite à la lésion. Pour rappel, les CSPG sont des molécules associées à la matrice extracellulaire qui inhibent la repousse axonale *in vitro* (Brown et al. 2012; Hang Wang et al. 2008) et *in vivo* durant le développement (Snow et al. 1990).

Quelques molécules de guidage conventionnelles sont dérivées de la myéline dans le SNC adulte, comme par exemple : Ephrin-B3 (Benson et al. 2005), Sema4D (Moreau-Fauvarque et al. 2003) et Netrin-1 (Löw et al. 2008). Ces molécules et les protéines associées à la myéline (Nogo, MAG, OMgp) font de la myéline une source d'inhibition pour la croissance axonale dans le SNC adulte. En fait, les molécules de guidage n'exercent pas un rôle répulsif *per se*, puisqu'elles ne modifient pas réellement la direction des axones. Elles participent plutôt à la formation de la barrière chimique à la croissance axonale qui empêche la régénération et limite la plasticité dans le SNC adulte.

c- Manque de guidage dans le système nerveux central adulte

La régénération fonctionnelle du SNC adulte lésé ne dépend pas seulement d'un environnement permissif à la croissance. En effet, même dans les modèles de régénération à longue distance, les fibres qui régénèrent présentent des défauts de guidage ne leur

permettant pas de reconnecter leurs cibles et expliquant l'absence de retour fonctionnel (Vincent Pernet et Schwab 2014; Crair et Mason 2016), tel qu'abordé dans les chapitres précédents. Dans le système visuel, la co-activation de voies de signalisation intervenant dans le développement conduit à une régénération robuste et à longue-distance des CGR dans le nerf optique jusqu'au cerveau. Mais ces axones échouent à connecter leurs cibles car ils se perdent dans le chiasma optique ou évitent complètement leur cible (Luo et al. 2013; Belin et al. 2015; Pernet et al. 2013). Même si un retour des fonctions partiel peut être observé avec des approches combinatoires (de Lima et al. 2012), la reformation d'un circuit fonctionnel dans le système visuel nécessite de la plasticité basée sur l'activité neuronale (Lim et al. 2016), de la même manière que l'entraînement tâche-spécifique conditionne la plasticité du bourgeonnement (« sprouting ») des collatérales et le recâblage fonctionnel après une lésion de la moelle épinière (García-Alías et al. 2009; Griffin et Bradke 2020; Hollis et al. 2016). Des molécules de guidage sont exprimées dans le système visuel adulte intact, notamment au niveau du chiasma optique et du noyau suprachiasmatique (Conceição et al. 2019; Wen et al. 2020) : mais leurs rôles doivent être déterminés. De plus, plusieurs molécules et récepteurs de guidage sont surexprimés à la suite d'une lésion du nerf optique (Symonds et al. 2007; Vilallongue et al. 2022). Il reste à déterminer aujourd'hui comment ces facteurs influencent le guidage des axones en cours de régénération.

II- Mise en place de l'environnement chez l'adulte

a- Interaction avec la matrice extracellulaire

Les molécules de guidage interagissent étroitement avec la matrice extracellulaire (MEC). Tout d'abord, la MEC contrôle la localisation et/ou limite la diffusion des facteurs de guidage dans l'environnement. Au cours du développement, les dystroglycanes médient le guidage axonal en se liant à Slit dans la FP (Wright et al. 2012) et en interagissant avec le récepteur de guidage transmembranaire Celsr3 (Lindenmaier et al. 2019). Dans le cerveau adulte, Sema3A interagit avec les chaînes GAG des CSPG au sein des filets péri-neuronaux (« perineuronal nets » ou PNN), une structure particulière de la MEC, responsable de la stabilisation synaptique (De Wit et al. 2005; Vo et al. 2013). Ensuite, les composants de la MEC peuvent réguler le guidage axonal, soit en étant eux-mêmes des facteurs de guidage (par exemple, la glycoprotéine Tenascin-C qui maintient la croissance axonale via l'activation d'intégrines (Chen et al. 2010; Cheah et al. 2016)) ou en modulant l'activité d'autres facteurs de guidage (par exemple, les héparanes de sulfates promeuvent la signalisation Slit1/Robo1 et Netrin-1/DCC (Hu 2001; Matsumoto et al. 2007)). De plus, les protéines de la MEC et les facteurs de guidage peuvent agir de manière synergétique pour provoquer une réponse de guidage axonal. C'est le cas de la chaîne GAG répulsive nommée CSE des CSPG qui amplifie

la répulsion exercée par Sema3A (Dick et al. 2013). De manière similaire, la protéine de la MEC Fibulin-2 qui est surexprimée après une lésion de la moelle épinière augmente l'activité de collapse de Sema3A, alors qu'elle ne présente pas d'activité répulsive *per se* (Schaeffer et al. 2018). Enfin, inversement, les molécules de guidage peuvent contrôler la disposition de la MEC et son remodelage. Au cours de la fibrose des plaques d'athérosclérose, EphA2 régule le dépôt de fibronectine (Finney et al. 2017). La signalisation Slit2/Robo1 a également été impliquée dans l'activation de la fibrose et l'activation des cellules étoilées hépatiques en promouvant l'expression de collagène I potentiellement via l'activation des voies de signalisation Smad2/3 et PI3K/AKT (Chang et al. 2015). Ainsi, les interactions entre molécules de guidage et MEC renforcent leur rôle essentiel dans la mise en place et le maintien de la structure des tissus chez l'adulte. Dans un contexte de régénération suite à une lésion, il faudra considérer l'interaction entre les molécules de guidage et la MEC pour la correcte mise en place du circuit réparé.

b- Régulation de la mise en place de la cicatrice gliale dans le SNC adulte

A la suite d'une lésion du SNC, de nombreux événements cellulaires se mettent en place pour initier la formation de la cicatrice gliale : recrutement de monocytes et de neutrophiles, infiltration des macrophages, activation de la microglie, fibrose, astroglie réactive. Les molécules de guidage et leurs récepteurs sont directement impliqués dans cette chorégraphie très organisée lors de la formation de la cicatrice. La migration des astrocytes réactifs jusqu'au site de lésion fait intervenir EphrinB2, qui contrôle en partie la réponse astrogliale (Chen et al. 2013). Le tri cellulaire et la ségrégation sont initiés trois jours après la lésion de la moelle épinière via l'interaction des astrocytes exprimant EphrinB2 et les fibroblastes des méninges exprimant EphB2 (Bundesen et al. 2003) : ces deux populations commencent ainsi à former une barrière de tissu. L'extinction de EphrinB2 *in vitro* réduit l'interaction entre astrocytes et fibroblastes et améliore la repousse axonale (Li et al. 2017).

L'organisation moléculaire et cellulaire de la cicatrice gliale en fait une barrière physique pour la régénération axonale. Cependant, cette cicatrice joue également des rôles positifs permettant de limiter la toxicité et l'inflammation et de reconstruire le tissu endommagé. Dans la cicatrice gliale, les longs prolongements des astrocytes réactifs contiennent l'inflammation au niveau du site de lésion (Wanner et al. 2013). Dans des conditions pro-régénératives, telles que l'activation de la voie mTOR, les axones qui régénèrent s'associent avec les astrocytes réactifs qui fabriquent des ponts (« bridge-forming reactive astrocytes »), dont la migration et l'organisation sont contrôlées par des facteurs de guidage au moment de la lésion (Zukor et al. 2013). Loin d'agir seulement de manière négative sur la régénération, les astrocytes réactifs pourraient, en effet, constituer un échafaudage permettant aux axones de régénérer dessus (Anderson et al. 2016). Les cellules gliales modulent de nombreuses molécules de guidage,

pouvant permettre la régénération. Elles diminuent l'expression de Sema3F, Sema3A et Slit2 et augmentent l'expression de Netrin1 dans les cellules non-astrocytaires de la cicatrice gliale (Anderson et al. 2016). Pour soutenir le rôle des molécules de guidage dans la formation de la cicatrice gliale, une analyse transcriptomique des astrocytes réactifs a révélé la surexpression de facteurs promouvant la croissance et la diminution de l'expression de facteurs inhibiteurs pour la régénération (Teh et al. 2017).

Enfin, des analyses transcriptomiques de microglie et de macrophages après une lésion de la moelle épinière ont montré qu'un certain nombre de molécules et récepteurs de guidage y étaient régulés (Zhou et al. 2020). De manière intéressante, PlexinB2 est surexprimée dans ces cellules et est nécessaire au retour des fonctions motrices et sensorielles après une lésion de la moelle. PlexinB2 est nécessaire aux étapes protectrices de cicatrisation, de confinement des cellules immunitaires et de compaction de la MEC lors de la formation de la cicatrice (Zhou et al. 2020). Tous ces éléments confirment (i) l'effet bénéfique des cellules gliales activées dans la protection nerveuse et la réparation après une lésion de la moelle épinière, et (ii) le rôle essentiel des molécules de guidage dans la structuration des cellules et de l'environnement du SNC adulte lésé.

c- Connectivité dans le système nerveux périphérique adulte

La capacité du SNP adulte à régénérer repose en partie sur l'environnement neuronal favorable à la croissance axonale (Figure 14). A la suite d'une lésion du SNP, les cellules de Schwann sont capables de proliférer et migrer au site de lésion pour former du nouveau tissu et combler la brèche, et de s'organiser en corridors permissifs pour la croissance axonale promouvant la réparation nerveuse (Rosenberg et al. 2014). Les fibroblastes exprimant EphrinB2 contrôlent le tri des cellules de Schwann par des signalisations de contact avec les récepteurs EphB2. De plus, les cellules de Schwann exprimant EphB2 promeuvent l'expression de N-cadhérine médiée par Sox2 pour soutenir la croissance axonale (Parrinello et al. 2010). A la suite d'une lésion du SNP, la régénération axonale repose également sur l'expression équilibrée des récepteurs de Netrin1 (DCC et Unc5H2) par les cellules de Schwann activées : DCC est surexprimé après la lésion alors que Unc5H2 est diminué. Un mauvais équilibre de leur expression altère l'activation des cellules de Schwann et inhibe la réparation nerveuse (Webber et al. 2011). De plus, les cellules de Schwann expriment Slit2, Slit3 et Robo1 dans les nerfs périphériques (Carr, Parkinson, et Dun 2017). L'expression de Slit2 diminue après la lésion du nerf sciatique, alors que l'expression de Slit3 et Robo1 augmente (Chen, Carr, et Dun 2019). En effet, Slit3 est exprimé par les macrophages autour de la lésion et exerce une activité répulsive sur les cellules de Schwann et les fibroblastes qui présentent Robo1 sur leur membrane pour les confiner le long de la lésion (Dun et al. 2019). Pour conclure, une régénération axonale efficace requiert une grande organisation spatiale

des cellules soutenant la croissance dans le SNP et une limitation des dommages du tissu. Ces mécanismes dépendent de la distribution et de l'activation des signalisations par les molécules de guidage dans le SNP adulte.

d- Organisation cellulaire dans le système vasculaire adulte

Un des rôles clé des molécules de guidage chez l'adulte est de mettre en place et maintenir l'environnement cellulaire du système cardiovasculaire (**Figure 14**). Dans le système mature, il y a une forte correspondance entre la morphologie des branches vasculaires et le réseau nerveux. Ceci repose sur des programmes de guidage développementaux partagés : des signaux de guidage similaires induisent les mêmes effets sur le cytosquelette et l'arrangement des adhésions focales dans les axones et les cellules endothéliales. On observe des événements de bourgeonnement, d'élongation et d'élagage similaires lors de l'établissement de ces deux réseaux. Par exemple, l'activité répulsive de Netrin1 cause une rétraction des filopodes ayant pour conséquence la répulsion des cellules endothéliales via la signalisation du récepteur Unc5b (Lu et al. 2004). Dans ce contexte, les molécules de guidage apparaissent comme des régulateurs clé de la morphologie des organes, de la structure de l'environnement et du positionnement des cellules. De plus, le rôle des facteurs de guidage dans la physiologie et la pathologie vasculaires chez l'adulte est d'orchestrer la structure globale du système vasculaire, de médier les interactions cellules-cellules et d'assurer la mécanique des tissus pour leur bon fonctionnement. Les événements angiogéniques relatifs à des blessures ou à la formation de tumeurs reposent sur les mêmes programmes de guidage que la migration des cellules endothéliales et de la morphogénèse des vaisseaux sanguins pendant le développement. De plus, plusieurs molécules de guidage régulent le recrutement et la prolifération des péricytes et des cellules musculaires lisses vasculaires sur les cellules endothéliales, positivement (via Netrin1 (Fan et al. 2008), Netrin4 (Lejmi et al. 2014), Sema3A/Nrp1 (Jurisic et al. 2012), Sema4D/PlexinB1 (Wu et al. 2020)) ou négativement (Slit2/Robo1, Robo4 (Guijarro-Muñoz et al. 2012) et Sema3E/PlexinD1 (Wu et al. 2017)). La signalisation EphB/EphrinB est impliquée dans la communication à courte portée et l'adhésion cellulaire des cellules endothéliales et du muscle lisse avec les péricytes. La spécialisation des cellules endothéliales est contrôlée par l'expression répulsive d'EphrinB2 dans les artères et EphB4 dans les veines, pendant le développement (Wang, Chen, et Anderson 1998; Lindskog et al. 2014) et chez l'adulte (Gale et al. 2001).

Afin de reconstruire un circuit nerveux fonctionnel suite à une lésion, comme évoqué précédemment, il sera nécessaire de moduler l'expression des molécules de guidage. Cependant, nous venons de souligner le rôle essentiel de ces facteurs de guidage dans la mise en place du système vasculaire. Il faudra donc prendre en compte cette implication pour

obtenir un circuit nerveux réparé qui est normalement vascularisé. En effet, une hyper- ou une hypo-vascularisation mènera au déclin de ce circuit nouvellement formé.

III- Les molécules de guidage contrôlent l'identité cellulaire chez l'adulte

a- Communication et signalisation cellulaires dans le système immunitaire adulte

Dans le système immunitaire adulte, la migration cellulaire et l'activation cellulaire sont associées dans de nombreux événements de la réponse du système immunitaire. Les molécules de guidage sont d'importants modulateurs de la migration cellulaire, du recrutement et du tri ainsi que de l'activation cellulaire et de la régulation de l'identité cellulaire (Figure 14). C'est pourquoi le rôle des molécules de guidage dans la communication, la signalisation et l'identité cellulaires doivent être pris en compte dans le contexte post-lésion de régénération pour pouvoir former un nouveau circuit nerveux fonctionnel.

Sema3A est un régulateur négatif de la migration des monocytes et des cellules T et il promeut l'apoptose cellulaire (Ji, Park-Min, et Ivashkiv 2009). Au contraire, Sema7A, qui a des effets bénéfiques sur la croissance axonale au cours du développement, agit comme un attractant et un activateur des monocytes (Holmes et al. 2002; Xie et Wang 2017). Dans le contexte de la réponse inflammatoire, Sema3F et Nrp2 sont tous deux exprimés par les neutrophiles recrutés sur le lieu de l'inflammation. En modulant le cytosquelette d'actine, ils augmentent leur rétention à ce niveau : Sema3F constitue donc une cible thérapeutique intéressante pour résoudre le problème de persistance de l'inflammation par les neutrophiles (Plant et al. 2020).

Dans un contexte de neuro-inflammation, les molécules de guidage jouent un rôle spécifique d'activateur de glie (Lee et al. 2019). Par exemple, Netrin1, produit par les cellules endothéliales, réduit l'activation des astrocytes et de la microglie exprimant le récepteur Unc5b (Podjaski et al. 2015; X. He et al. 2018; Xie et al. 2018).

Le rôle des molécules et récepteurs de guidage est prépondérant dans les modèles de sclérose multiple (SM) et d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). Les sémaphorines sont impliquées dans la pathogénèse de la SM en régulant l'activation, la migration et l'infiltration des cellules immunitaires. Ceci a des conséquences néfastes sur le recrutement des précurseurs des oligodendrocytes et sur la survie des oligodendrocytes (Takamatsu, Okuno, et Kumanogoh 2010; Okuno, Nakatsuji, et Kumanogoh 2011).

b- Maintenance des niches de cellules souches chez l'adulte

Les niches de cellules souches chez l'adulte nécessitent une étroite régulation de leur prolifération et différenciation. En effet, elles doivent maintenir un pool de cellules dans un état quiescent et contrôler la différenciation et la prolifération des cellules progénitrices nécessaires pour le renouvellement des tissus. Les molécules de guidage jouent un rôle important dans

cette régulation d'identité cellulaire (**Figure 14**). Dans un contexte de régénération, il faut ainsi prendre en compte le rôle des molécules de guidage dans la régulation de l'identité des cellules souches, notamment pour permettre une reconstruction efficace du tissu lésé.

Niche de cellules souches neurales

Dans le cerveau adulte de rongeur, la neurogénèse est limitée à des niches neurogéniques spécifiques. Parmi elles, se trouve la zone sub-ventriculaire (SVZ) des ventricules latéraux de laquelle les progéniteurs neuronaux migrent vers le bulbe olfactif ; et la zone sub-granulaire (SGZ) du gyrus denté dans l'hippocampe, là, les nouveaux neurones sont supposés participer à l'apprentissage et à la mémoire chez l'adulte. Des molécules de guidage participent au maintien de cette niche. C'est le cas des éphrines : EphrinB3 régule négativement la prolifération des cellules souches neuronales (CSN) (Ricard et al. 2006) en interagissant avec EphB3 dans la SVZ (del Valle et al. 2011) et avec EphB1 dans la SGZ (Chumley et al. 2007). Netrin1, via son récepteur Neogenin, induit la différenciation des neuroblastes en promouvant la sortie du cycle cellulaire (O'Leary et al. 2015). RGMA, quant à lui, inhibe la neurogénèse, la croissance neuritique dans l'hippocampe adulte, tout en assurant la migration correcte des neurones (Isaksen, Fujita, et Yamashita 2020). Enfin, les sémaphorines de classe IV promeuvent la prolifération dans la SVZ : l'expression de Sema4C coïncide dans le temps et l'espace avec la neurogénèse (Wu et al. 2009). L'implication des molécules de guidage dans le maintien des niches de cellules souches neuronales devra être prise en compte dans les stratégies de régénération utilisant la modulation des facteurs de guidage dans le but de reconnecter les circuits neuronaux.

IV- Les fonctions des molécules de guidage chez l'adulte

En conditions physiologiques, les molécules de guidage jouent des rôles essentiels dans le cerveau adulte. Elles permettent notamment la plasticité synaptique et donc la mise en place et le maintien de la mémoire (**Figure 14**).

Dans un contexte de régénération, nous observons de graves défauts de guidage compromettant la reconnexion correcte des fibres nerveuses. Notre hypothèse est donc la modulation de l'expression des molécules de guidage afin de corriger la navigation axonale. Les stratégies qui seront adoptées dans cet objectif doivent prendre en compte le rôle « physiologique » des molécules de guidage, pour ne pas mettre en péril la plasticité et la mémoire.

a- Formation des synapses et élagage

Les molécules de guidage sont impliquées dans la mise en place et le maintien des réseaux neuronaux tout au long de la vie et en particulier de la formation et de la stabilité des synapses

(Figure 14). Pendant le développement, les Eph participent à différentes étapes de la synaptogénèse : la structuration de la synapse, la mobilité des filopodes dendritiques, la stabilisation du contact synaptique et la maturation synaptique (Dalva et al. 2000; Kayser et al. 2006; Henkemeyer et al. 2003). D'autres facteurs de guidage, tel que le morphogène Wnt sont responsables du clustering des protéines pré- et post-synaptiques (Cerpa et al. 2008; Hall, Lucas, et Salinas 2000; Farías et al. 2009; Ahmad-Annuar et al. 2006). D'une part, Netrin1 augmente le nombre et la force des synapses excitatrices des neurones corticaux en interagissant avec son récepteur DCC. D'autre part, à travers la traduction de protéines dépendante de Src et de mTOR agissant sur le cytosquelette d'actine, Netrin1 permet le clustering des protéines pré- et post-synaptiques (Goldman et al. 2013).

En plus d'être impliquées dans la synaptogénèse, les molécules de guidage participent à la fonction des synapses. Tout d'abord, Semaphorine 3A et son récepteur Nrp1 participent à la modulation de la morphologie des synapses. En effet, Semaphorine 3A induit la rétraction de l'élément post-synaptique (de manière comparable à celle du cône de croissance due à l'action répulsive de Semaphorine 3A pendant le développement) conduisant à la collapse de l'élément pré-synaptique. Ce mécanisme est responsable d'une dépression dans les neurones hippocampiques adultes (Bouzioukh et al. 2006). De plus, les Ephrins B (impliquant les récepteurs EphB2 et EphA4) sont requises pour les LTP (« long term potentiation ») dans l'hippocampe (Bouzioukh et al. 2007). Ensuite, la phosphorylation d'une sérine de Ephrins B2 induit la régulation du trafic et de la stabilisation des récepteurs AMPA. Les souris qui n'expriment plus Ephrins B2 présentent une amplification de l'endocytose des récepteurs AMPA et une réduction de la transmission synaptique (Essmann et al. 2008). De plus, la famille des Wnts joue un rôle dans la plasticité synaptique. En effet, Wnt-5a permet le recyclage des récepteurs GABA_A dans les neurones hippocampiques matures (Cuitino et al. 2010). Il augmente également les courants synaptiques NMDA dans l'hippocampe de rat, facilitant l'induction de la LTP (Cerpa et al. 2011). Cette classe de facteurs de guidage est également impliquée dans la modulation du cycle des vésicules synaptiques (Inestrosa et Arenas 2010).

b- Formation de la mémoire et plasticité

La capacité des synapses à se renforcer de manière activité-dépendante constitue leur plasticité, phénomène critique pour la mémoire et l'apprentissage. Netrin1 est une molécule de guidage essentielle pour la plasticité synaptique et la formation de la mémoire. Outre son rôle dans la synaptogénèse, une étude récente (Glasgow et al. 2018) a montré l'existence d'une exocytose de Netrin1 et de son récepteur DCC dépendant de l'activité, qui pourrait influencer la différenciation synaptique et la plasticité en potentialisant les synapses excitatrices. En effet, Netrin1 et DCC sont présents dans les vésicules synaptiques : leur relargage depuis les dendrites favorise la stabilisation synaptique et le remodelage structurel

après la LTP, notamment en activant localement la synthèse protéique (Tcherkezian et al. 2021). A travers leur rôle dans le renforcement des synapses et dans la structure des épines dendritiques des neurones de l'hippocampe, Netrin1/DCC ont un effet essentiel sur le fonctionnement synaptique et par conséquent la formation de la mémoire spatiale. L'interaction de Netrin1 avec son récepteur DCC provoque une cascade de signalisation intracellulaire en aval des récepteurs NMDA : ceci conduit au recrutement des récepteurs AMPA à la surface post-synaptique des synapses excitatrices et donc à la LTP (Glasgow et al. 2020). La délétion conditionnelle de DCC dans les neurones hippocampiques glutamatergiques conduit à une détérioration de la mémoire spatiale, associée à une morphologie des épines dendritiques anormale ainsi qu'à un niveau réduit d'adaptateurs post-synaptiques (Wong et al. 2019).

D'autres molécules sont connues pour intervenir dans la plasticité synaptique, notamment des molécules d'adhésion cellulaire neuronale. NCAM s'accumule précocement au niveau de la synapse en formation (Sytnyk et al. 2002) ; sa surexpression dans des neurones hippocampiques en culture conduit à la formation de synapse (Dityatev et al. 2004). Plus récemment, NrCAM a été caractérisé comme un nouveau régulateur postnatal de la densité des épines dendritiques dans les neurones pyramidaux corticaux : là-bas, il s'associe avec le complexe récepteur de Sema3F pour contrôler l'équilibre entre synapses excitatrices et inhibitrices (Demyanenko et al. 2014).

Les filets périneuronaux (PNN) sont des structures de MEC très condensées qui se forment autour du corps cellulaire des neurones et qui s'étendent le long de leurs dendrites. Les PNN se forment après la naissance, en parallèle de la fermeture de la période critique correspondant au moment où le circuit synaptique mature se stabilise. Par exemple, Aggrecan est essentiel pour la formation des PNN dans le cerveau : sa délétion conduit au rétablissement de la plasticité de dominance oculaire juvénile (Rowlands et al. 2018). Les PNN inhibent la croissance et restreignent aussi la plasticité des connexions synaptiques par plusieurs biais : ils limitent la mobilité des récepteurs AMPA en surface (Frischknecht et al. 2009) et s'associent à des molécules de guidage répulsives telles que Sema3A (Vo et al. 2013). La distribution de Sema3A dans les PNN s'ajoute à l'action inhibitrice pour la croissance des chaînes GAG sulfatées des CSPG. La délétion de Sema3A inverse les propriétés inhibitrices pour la croissance des PNN (Vo et al. 2013). Bien que l'expression de Sema3A dans le SNC adulte soit associée à une plasticité et une connectivité détériorée après la lésion, elle participe au bon fonctionnement du circuit en empêchant la connexion de fibres inappropriées dans le cerveau intact. Lors de la régénération impliquant la modulation des molécules de guidage, il faudra prendre en compte le rôle des facteurs de guidage dans le maintien de la mémoire et de la plasticité synaptique.

c- Modification de l'expression des molécules de guidage et conséquences

Les molécules de guidage sont impliquées dans l'altération des fonctions physiologiques, conséquences des changements dans l'environnement des cellules et des tissus. En effet, il y a une corrélation entre modification de l'expression des molécules de guidage et dégradation des fonctions normales chez l'adulte (**Figure 14**). Dans cette partie, les conséquences de la modification de l'expression des facteurs de guidage, pouvant être dramatiques, seront évoquées. Nous soulignons ainsi la prudence dont on doit faire preuve lorsque l'on module ces molécules, notamment dans un contexte de reconstruction du circuit nerveux.

c.1- Vieillessement

Le vieillissement est un exemple de changement qui peut être accompagné de déficits cognitifs. Une diminution dans le niveau synaptique de NCAM a été associée à un vieillissement normal et peut augmenter la susceptibilité d'avoir des altérations cognitives dues à l'âge (**Bisaz et al. 2013**). Dans une étude récente (**Galatro et al. 2017**), les chercheurs ont décrit une diminution de l'expression des molécules de guidage dans la microglie avec l'âge. Ces changements reflètent une diminution de la motilité et de la migration cellulaires ainsi qu'une diminution de la fonction de la microglie. En effet, les molécules de guidage permettent normalement aux prolongements de la microglie de sentir l'environnement et d'initier la chimiotaxie : fonction diminuée avec l'âge.

c.2- Troubles neurologiques et maladies neurodégénératives

Des modifications dans l'expression des molécules de guidage peuvent conduire à de nombreux troubles cognitifs. Tout d'abord, des mutations dans les gènes codant pour des molécules de guidage et leurs récepteurs peuvent être responsables de troubles congénitaux : mouvement miroir (mutation dans le gène DCC (**Srouf et al. 2010; Depienne et al. 2011**)), paralysie horizontale du regard avec une scoliose progressive ou HGPPS (mutation dans le gène Robo3 (**Chan et al. 2006; Amouri et al. 2009**)). De plus, des changements dans l'expression ou la fonction de molécules de guidage conduisent à des maladies multifactorielles telles que l'autisme pour lequel la connectivité est affectée dès le développement. Chez les souris déficientes pour NCAM2, on observe une organisation anormale des axones reflétant des branchements dendritiques réduits qui se suivent de troubles cognitifs dans le syndrome de Down et l'autisme (**Sheng, Leshchyns'ka, et Sytnyk 2015**).

Par ailleurs, l'altération tardive du guidage axonal peut être responsable de défauts de connectivité qui mènent à des maladies neurodégénératives et à des affections cardiovasculaires ou du système immunitaire. Dans la sclérose amyotrophique latérale (ALS), la dérégulation de molécules de guidage (Sema3A (**Winter et al. 2006**), EphA4 (**Van Hoecke et al. 2012**)) contribue à la dénervation de la jonction neuromusculaire menant à la mort des

motoneurones. Les molécules de guidage sont également décrites pour leur rôle dans le développement dopaminergique. Leur perturbation induit une dégénération de ces neurones, caractéristique de la maladie de Parkinson (Lesnick et al. 2007). De plus, les molécules de guidage jouent un rôle dans la pathogénicité de la maladie de Parkinson : des polymorphismes de nucléotide simple ont été trouvés dans les gènes de guidage tels que DCC, NetrinG1, Sema5A et Slit3 chez les patients parkinsoniens (Maraganore et al. 2005; Fung et al. 2006; Papapetropoulos et al. 2018). Ces modifications pourraient être utilisées comme des marqueurs pré-cliniques pour la maladie de Parkinson et comme cibles thérapeutiques.

La maladie d'Alzheimer semble également impliquer une modification de l'expression des molécules de guidage dont la signalisation des Semas, des Slits, des Eph (Good et al. 2004; Antonell et al. 2013). Dans la maladie d'Alzheimer, l'augmentation de l'activité de Sema3A conduit à une répulsion axonale amplifiée, à une rétraction synaptique et enfin, à la mort cellulaire (Good et al. 2004). Cette augmentation d'activité de Sema3A pourrait être due à une augmentation de la phosphorylation de CRMP2 (médiée par A β) (Petratos et al. 2008).

Les défauts de guidage axonal peuvent également contribuer à la progression de la maladie. Par exemple, dans l'épilepsie, après des crises répétées, de nouvelles fibres moussues sont générées dans les cellules granulaires du gyrus denté mais elles innervent de manière aberrante la couche moléculaire de l'hippocampe. Cette réorganisation synaptique implique les sémaphorines (Holtmaat 2003; Barnes et al. 2003).

V- Dysfonction moléculaire et cellulaire dans le cancer

L'implication des molécules et récepteurs de guidage dans le cancer se fait à différents niveaux de la pathogénicité de la maladie et de sa progression (Figure 14). De nombreuses molécules de guidage ont leur expression dérégulée dans les cellules cancéreuses à cause de dérégulations épigénétiques (Dallol et al. 2003; Li et al. 2009) ou de mutations somatiques (Je et al. 2013; Sorber et al. 2016; Biankin et al. 2012). Jusqu'à présent, il y a peu de preuves du rôle des molécules de guidage dans l'innervation des tumeurs (Boilly et al. 2017). Cependant, il est clair qu'elles participent à la formation des tumeurs à différents niveaux : invasion cellulaire, angiogenèse, survie cellulaire et métastase (Chédotal, Kerjan, et Moreau-Fauvarque 2005). Cependant les mécanismes moléculaires ne sont pas parfaitement compris à cause de l'aspect multifacettes du cancer, des différents organes qui peuvent être affectés et de l'hétérogénéité des cellules cancéreuses. Le mécanisme de guidage axonal fait partie des voies modifiées dans les analyses génomiques ou protéomiques chez les modèles de cancer ou les lignées cellulaires (Sorber et al. 2016; Yuannv Zhang et al. 2014; Bailey et al. 2016). On ne peut pas déclarer que la dérégulation des molécules de guidage entraîne la

formation de tumeurs, mais elle participe à la mise en place et à l'évolution de la maladie. Une fois de plus, la modulation de l'expression des molécules de guidage a des conséquences sévères sur l'organisme. C'est pourquoi, leur modification dans le but de reconstruire un circuit nerveux fonctionnel doit se faire avec beaucoup de précautions.

Régulation de la signature des cellules cancéreuses

Au-delà de leur rôle structural dans la formation des tumeurs, l'angiogenèse et l'envahissement des cellules cancéreuses, il semblerait que les molécules de guidage aient des activités de gènes suppresseurs de tumeurs et oncogéniques. Récemment, le rôle de Netrin1/Neogenin/Unc5b dans l'attribution du devenir des cellules durant la préimplantation des embryons a été mis en évidence (Huyghe et al. 2020). Ce rôle inattendu dans le contrôle de la pluripotence soulève de nombreuses questions sur le rôle des molécules de guidage dans le contrôle de l'identité des cellules dans le cancer. Dans le glioblastome, le haut niveau d'expression d'EphA2 maintient les propriétés de cellules souches des cellules tumorales (Binda et al. 2012).

Les molécules de guidage pourraient être directement impliquées dans la régulation de la voie oncogénique (Harburg et Hinck 2011). C'est le cas du suppresseur de tumeur Sema3F, dont la signalisation via Nrp2 et PlexinA1 inhibe la phosphorylation d'Akt, interrompant l'assemblage des complexes 1 et 2 de mTOR et réduisant ainsi la taille des tumeurs (Nakayama et al. 2015). Dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, Slit2 possède un effet suppresseur de tumeur en activant la voie Akt/ β -caténine (Prasad et al. 2008; Shi et al. 2014). D'autre part, le couple Netrin1/Neogenin favorise la prolifération cellulaire (Yin et al. 2017) et Netrin1 surexprime l'oncogène c-myc (Chen et al. 2017).

De plus, les molécules et les récepteurs de guidage sont impliqués dans le contrôle de la survie cellulaire via la régulation de l'apoptose. Par exemple, la liaison de Sema3E à PlexinD1 empêche la mort des cellules tumorales en bloquant la voie d'apoptose mitochondriale médiée par NR4A1 en aval de PlexinD1 (Luchino et al. 2013). Par conséquent, le blocage de l'interaction Sema3E/PlexinD1 représente une stratégie thérapeutique pour le traitement du cancer. Par ailleurs, Sema3B présente une activité pro-apoptotique et de suppression de la croissance tumorale (Tomizawa et al. 2001; Castro-Rivera et al. 2004). Enfin, la signalisation de Netrin1 montre un mécanisme de sélectivité de survie des cellules cancéreuses (Fitamant et al. 2008). La délétion des récepteurs DCC et Unc5h de Netrin1 dans certains cancers, réduit les cascades pro-apoptotiques et améliore la survie cellulaire (Tanikawa et al. 2003; Mazelin et al. 2004; Delloye-Bourgeois et al. 2009).

La grande diversité des formes de cancer et l'hétérogénéité intra-tumorale rendent difficile l'évaluation de l'implication des molécules de guidage dans le contrôle de la prolifération et de

la survie cellulaire. De plus, les multiples communications entre les différentes voies de signalisation, les combinaisons de complexes de récepteurs et tous les autres aspects de la formation des tumeurs et de leur progression ajoutent des niveaux de complexité supplémentaires pour la compréhension de la signature des cellules tumorales. Néanmoins, de nombreuses études se focalisent sur la mise en place de stratégie de traitements ciblant les molécules de guidage. C'est pourquoi le contrôle de la prolifération anarchique et de la résistance à l'apoptose constitue un grand axe de recherche thérapeutique contre le cancer.

Dans notre contexte de régénération, nous devons tenir compte de tous les aspects dans lesquels les molécules de guidage sont impliquées. En effet, la modification de leur expression peut avoir des conséquences terribles. Il faut donc rediriger les axones en cours de régénération en modulant les molécules de guidage mais de façon très précise et précautionneuse afin de reconstruire un circuit nerveux fonctionnel sans créer de nouvelles pathologies.

OBJECTIFS DU PROJET DOCTORAL

Le système nerveux central (SNC) est incapable de régénérer après une lésion, ce qui conduit à des pertes irréversibles de fonctions motrices, cognitives et/ou sensorielles. Grâce au développement d'approches combinatoires de modulations moléculaires, nous sommes en capacité de promouvoir une régénération robuste et à longue distance des axones du SNC, notamment en utilisant le modèle du système visuel (appartenant au SNC). Cependant, cette repousse spectaculaire s'accompagne de graves défauts de projections des axones qui empêchent la reformation du circuit nerveux. Il est donc primordial de **comprendre les modalités de guidage axonal dans le système nerveux central adulte afin de reconstruire un circuit nerveux fonctionnel et permettre le retour des fonctions.**

Pour cela, mon projet doctoral se découpe en deux grandes parties et plusieurs sous-parties, que je détaille ci-dessous :

1. Caractérisation de l'expression des molécules de guidage dans le système visuel adulte
 - i. Cartographie des molécules de guidage exprimées dans les différentes cibles du système visuel adulte intact par analyse protéomique
 - ii. Détermination de l'effet de la lésion sur l'expression des molécules de guidage
 - iii. Mise en évidence de la réponse ligand-récepteur chez l'adulte
 - iv. Modulation de l'expression de facteurs de guidage sur la régénération
2. Modulation du guidage axonal pour réinnervier une cible spécifique : le noyau suprachiasmatique (NSC)
 - i. Compréhension du mécanisme d'évitement des axones des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) envers le NSC : identification de molécules de guidage répulsives
 - ii. Modulation de l'expression de ces molécules de guidage dans un contexte de régénération
 - iii. Déterminer la nature des axones qui réinnervent le NSC
 - iv. Définir si le circuit nouvellement formé est fonctionnel

Les résultats obtenus au cours de ma thèse se trouvent ci-dessous. La première partie concernant l'analyse protéomique des cibles du système visuel adulte constitue un article publié dans le journal Nature Communications. La deuxième partie sera soumise pour publication très prochainement : les résultats découlant de cette partie sont présentés sous sa forme d'article, tel qu'il sera soumis lorsqu'il sera terminé.

RESULTATS

Article 1 : Guidance landscapes unveiled by quantitative proteomics to control reinnervation in adult visual system

Noemie Vilallongue¹, Julia Schaeffer¹, Anne-Marie Hesse, Céline Delpech, Béatrice Blot, Antoine Paccard, Elise Plissonnier, Blandine Excoffier, Yohann Couté, Stephane Belin² et Homaira Nawabi²

¹ Les auteurs ont contribué de manière égale

² Les auteurs ont co-supervisé l'étude

Toutes atteintes du système nerveux central (SNC) conduit à des pertes irréversibles de fonctions motrices, sensorielles et/ou cognitives. En effet, contrairement au système nerveux périphérique, le SNC est incapable de régénérer spontanément. Cependant, en modulant des voies moléculaires chez l'adulte, les neurones du SNC sont désormais capables de régénérer sur de longues distances. L'étude de la régénération se fait sur plusieurs modèles dont le système visuel qui appartient au SNC. En modulant des voies moléculaires des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR), ces cellules envoient leur axone au-delà du chiasma optique. Toutefois, les axones ne parviennent pas à reconnecter leurs cibles appropriées dans le cerveau. En effet, ils sont perdus au niveau du chiasma optique, repartent vers l'œil dont ils proviennent ou se dirigent vers l'œil controlatéral. Cette absence de reconnexion et la formation potentielle de circuits aberrants compromettent la reconstruction du circuit neuronal et donc le retour des fonctions.

Afin de permettre aux axones de réinnerver leurs cibles adéquates, l'hypothèse de la modulation du guidage axonal émerge. Pour ce faire, la caractérisation de l'expression des molécules de guidage dans les différentes cibles du système visuel adulte est essentielle afin de comprendre les modalités de la réinnervation dans un contexte mature. C'est pourquoi, nous avons réalisé la première cartographie des molécules de guidage présentes dans les principales cibles cérébrales connectées par les CGR : le noyau suprachiasmatique (NSC), le corps genouillé latéral dorsal (dLGN) et le colliculus supérieur (SCol) ; nous nous sommes également focalisés sur le chiasma optique, lieu d'observation des graves défauts de guidage dans les modèles de régénération. Grâce à une analyse par spectrométrie de masse, nous avons analysé le protéome des principaux noyaux du système visuel adulte. Nous avons ainsi mis en évidence que les molécules de guidage continuent d'être exprimées dans un système mature.

Notre objectif étant de moduler l'expression des molécules de guidage dans un contexte de régénération pour promouvoir la reformation des circuits neuronaux, nous nous sommes demandés si la lésion influençait l'expression de ces facteurs de guidage. Nous avons donc réalisé le protéome des cibles du système visuel 28 jours après une lésion bilatérale des nerfs optiques par pincement. Bien que la lésion modifie l'expression de nombreuses protéines au sein de ces cibles cérébrales, les molécules de guidage ne sont pas affectées : leur expression reste stable.

Après avoir montré que le guidage axonal initial, au cours du développement, nécessite une régulation très dynamique de l'expression des molécules de guidage, nous avons émis l'hypothèse que la stabilité des molécules de guidage, même après la lésion, doit contribuer à cette impossibilité de réinnervation des cibles.

Nous avons vérifié dans un premier temps si les CGR adultes exprimaient toujours les récepteurs des molécules de guidage grâce à l'analyse des données de transcriptomique des CGR disponibles. Nous avons donc la confirmation que ligands et récepteurs sont présents dans le système visuel mature. Afin de savoir si les CGR adultes continuaient de répondre aux molécules de guidage présentes dans l'environnement de leur axone, nous avons réalisé des expériences *ex vivo* de cultures d'explants rétiniens adultes provenant d'un modèle régénératif. Grâce à ces manipulations de stripe assay, nous avons mis en évidence que les axones des CGR adultes sont toujours sensibles à l'effet des molécules de guidage.

Enfin, nous avons utilisé un modèle de régénération combiné à une délétion de certains récepteurs de guidage afin d'empêcher l'interaction des axones des CGR avec les molécules de guidage présentes dans l'environnement neuronal. Ainsi, nous avons mis en évidence que la modulation du guidage axonal des neurones en cours de régénération était possible chez l'adulte. Cette étude montre le rôle essentiel du guidage axonal dans un contexte mature et prouve qu'il faudra tenir compte de ce phénomène dans la mise en place des thérapies visant à reconstruire les circuits neuronaux après une lésion du SNC.

Cette étude fait l'objet d'une publication dans le journal Nature Communications. J'y ai participé en tout point en réalisant les dissections des tissus préalables à l'analyse de spectrométrie de masse, en réalisant toute l'analyse bio-informatique qui en découle, en réalisant les coupes de tissus adultes, les marquages immunofluorescents, les hybridations *in situ*, les chirurgies (chez l'adulte : pincement du nerf optique ; chez l'embryon et en post-natal : injection intravitréenne de CTB), les dissections de tissus, les western blots, la mise en place du stripe assay et de la culture d'explants rétiniens adultes, la transparençation des tissus, la prise d'image, l'analyse, l'écriture du manuscrit, la mise en page des figures, la création des schémas et dessins.



Guidance landscapes unveiled by quantitative proteomics to control reinnervation in adult visual system

Received: 19 November 2021

Accepted: 30 September 2022

Published online: 13 October 2022

Check for updates

Noemie Vilallongue^{1,3}, Julia Schaeffer^{1,3}, Anne-Marie Hesse²,
Céline Delpech¹, Béatrice Blot¹, Antoine Paccard¹, Elise Plissonnier¹,
Blandine Excoffier¹, Yohann Couté², Stephane Belin^{1,4} &
Homaira Nawabi^{1,4} ✉

In the injured adult central nervous system (CNS), activation of pro-growth molecular pathways in neurons leads to long-distance regeneration. However, most regenerative fibers display guidance defects, which prevent reinnervation and functional recovery. Therefore, the molecular characterization of the proper target regions of regenerative axons is essential to uncover the modalities of adult reinnervation. In this study, we use mass spectrometry (MS)-based quantitative proteomics to address the proteomes of major nuclei of the adult visual system. These analyses reveal that guidance-associated molecules are expressed in adult visual targets. Moreover, we show that bilateral optic nerve injury modulates the expression of specific proteins. In contrast, the expression of guidance molecules remains steady. Finally, we show that regenerative axons are able to respond to guidance cues *ex vivo*, suggesting that these molecules possibly interfere with brain target reinnervation in adult. Using a long-distance regeneration model, we further demonstrate that the silencing of specific guidance signaling leads to rerouting of regenerative axons *in vivo*. Altogether, our results suggest ways to modulate axon guidance of regenerative neurons to achieve circuit repair in adult.

In adult mammals, neurons from the central nervous system (CNS) are unable to regenerate spontaneously following injury, leading to permanent and irreversible cognitive and motor disabilities in patients. This failure of regeneration has two main components: the inhibitory environment of the lesion site and the intrinsic properties of neurons themselves¹. Indeed, over the course of development, CNS neurons progressively lose their regenerative capabilities², and this decline is exacerbated after axon injury³. Recent studies combining genetic manipulations and pharmacological approaches have led to robust CNS regeneration, in particular in the visual system, one of the best studied CNS models in the field. In the mouse visual system, axons are

able to grow over long distances: up to several centimeters from the eye ball to the brain^{3–5}. Yet, despite long-distance growth, regenerative axons fail to resume their original path and grow in a disorganized manner with numerous guidance defects^{6,7}, preventing functional recovery. Indeed, regenerative retinal ganglion cells (RGC) axons display strong guidance defects^{8,9} as they get lost in the optic chiasm or grow in the contralateral optic nerve^{3,10}. These misguided axons may jeopardize functional recovery, with several issues arising: the number of regenerative axons reaching their proper targets may be insufficient to reform a functional circuit and/or lost axons may form aberrant connections, impairing further the formation of a functioning

¹University Grenoble Alpes, Inserm, U1216, Grenoble Institut Neurosciences, 38000 Grenoble, France. ²University Grenoble Alpes, INSERM, CEA, UMR BioSanté U1292, CNRS, CEA, FR2048, 38000 Grenoble, France. ³These authors contributed equally: Noemie Vilallongue, Julia Schaeffer. ⁴These authors jointly supervised this work: Stephane Belin, Homaira Nawabi. ✉ e-mail: homaira.nawabi@inserm.fr

neuronal circuit. Therefore, a critical question remains: can regenerative axons be guided in a mature brain?

During embryonic development, thousands of neurons project their axons over long distances to reach their functional targets. Axon navigation is oriented by neuronal response to guidance cues at critical choice points^{11,12} such as the optic chiasm. Guidance molecules, either attractive or repulsive, comprise soluble molecules that can act over long distances, such as secreted Semaphorins, Slits and Netrins, and transmembrane proteins acting locally, such as transmembrane Semaphorins and Ephrins. It is now well accepted that axon trajectory is not defined by a single ligand/receptor interaction. Indeed, it involves crosstalk among several cues or receptors that are specific of the axonal path^{13–15}. Guidance molecules act in addition to other factors such as the molecular machinery specific to each neuronal population¹⁶, the substrate stiffness¹⁷ or the neuronal activity^{18,19}. Furthermore, over the past years several molecules have been described to be involved in axon guidance such as morphogens (Shh, Wnt)^{20,21}, growth factors (TGF β , BMP)²² and adhesion molecules (LICAM, NrCAM)²³. The expression pattern and guidance activity of these cues have been studied during embryogenesis, allowing to generate a comprehensive guidance map during development. Notably, their role during midline crossing has been largely characterized in the developing visual system²⁴.

In contrast, in the context of regeneration in adult CNS, many unknowns of axon guidance remain, including whether regenerating axons have a functional machinery to respond to external guidance cues, or if the integration of these signalings could influence pathfinding and connectivity of regenerating axons. Thus, a characterization of the mature neuronal environment is essential to properly guide regenerative axons and obtain functional recovery. So far, most studies have focused on the lesion site itself and considered guidance cues as inhibitory for axon growth^{25,26}. However, with long-distance CNS regeneration models, axons overtake this lesion site. Therefore, it is critical to consider guidance cues for their primary role in axon pathfinding in order to overcome the failure of reinnervation. So far there is little data regarding guidance cues expression and their function in mature brain.

Here, we used mass spectrometry (MS)-based proteomics to analyze the protein content of the major functional nuclei in the mouse adult visual system innervated by RGC, as well as the optic chiasm, a critical choice point, where many guidance defects are observed

during regeneration^{3,7,10}. This way, we established the guidance landscape of mature visual system. Our results show that many guidance and guidance-associated factors (adhesion molecules, extracellular matrix components) are still expressed in the mature brain. We found that the expression of guidance cues and receptors remains stable upon injury, suggesting that the adult brain has an intrinsic guidance signature that may affect navigation of regenerating axons and more generally the connectivity of the injured circuit. Finally, using ex vivo and in vivo approaches, we demonstrate that (i) regenerative axons are still able to respond to guidance cues in the adult CNS and (ii) silencing of specific guidance signaling results in the reorientation of the trajectory of regenerative axons at the critical choice point. Indeed, the modulation of Ephrin-B3 or Sema4D signaling controls optic chiasm crossing. Altogether, our study provides evidence that axon guidance is still functional in the mature CNS and is particularly relevant in the context of axon regeneration and functional recovery.

Results

MS-based proteomic characterization of visual targets in the adult brain

The visual system has been thoroughly studied during development²⁷. Indeed, retinal ganglion cells (RGC) projections from the retina to the brain via the optic nerves are well characterized and guidance molecules that control this patterning have been identified, in particular for the process of midline crossing at the optic chiasm²⁷. Regarding the functional targets, several recent large scale studies have unraveled gene expression regulation during development and in adult^{28–30}, in particular in the developing lateral geniculate nucleus (LGN)^{31,32}. Here, we used MS-based proteomics to characterize the protein composition of mature brain regions innervated by RGC axons. To this end, we microdissected the selected brain regions (labelled with Alexa-coupled cholera toxin B injected into the eye): the suprachiasmatic nucleus (SCN), the ventral and the dorsal lateral geniculate nuclei (dLGN and vLGN) and the superior colliculus (SCol) (Fig. 1a–c). Since the optic chiasm is a critical intermediate region in which the majority of RGC axons get lost during regeneration, we also microdissected the adult optic chiasm to decipher cues that may influence guidance in adult (Fig. 1b, c). Thus, we obtained the proteomes of adult visual targets as presented in Supplementary Data 1.

Focusing on the 3000 most abundant proteins from each brain region - as ranked according to the intensity-based absolute

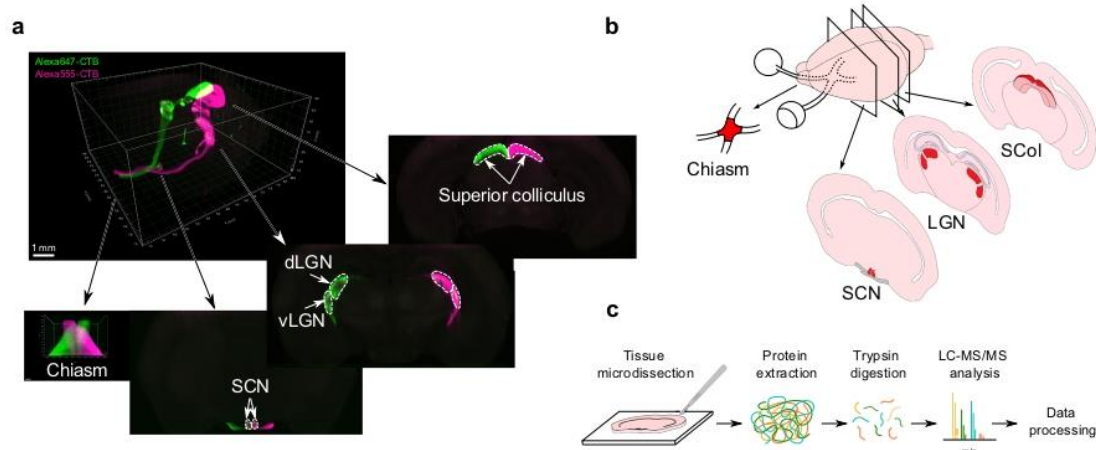


Fig. 1 | Proteomic analysis of adult visual targets. **a** 3D cleared brain imaged using light sheet microscopy highlighting the regions of interest. The two eyes were injected with Alexa555-conjugated CTB and Alexa647-conjugated CTB to allow visualization of ipsi- and contralateral projections within each visual brain target. **b** Diagram of the mouse visual targets used for the study. Primary targets of RGC

axons (indicated in red) and the optic chiasm were collected for the MS analysis. **c** Experimental design. Proteins were extracted from microdissected brain regions and analysed by LC-MS/MS after trypsin digestion. LC-MS/MS, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; SCN, suprachiasmatic nucleus; LGN, lateral geniculate nucleus; SCol superior colliculus. Scalebar: 1 mm.

quantification (iBAQ values³³), gene ontology (GO) analysis conducted with DAVID³⁴ revealed a high enrichment in proteins characteristic of neuronal activity and in proteins reflecting a high connectivity between the neuronal and glia partners in the different brain targets (Supplementary Fig. 1).

Adult visual targets express guidance and guidance-associated factors

We next aimed to characterize the molecular environment of adult axons to understand whether it could affect their guidance potential in a regenerative context. For that, we focused on guidance factors, as well as on proteins whose function or expression is linked to adhesion and extracellular matrix (Supplementary Data 2, Fig. 2, Supplementary Fig. 2a–d). Analysis of the proteomes in all visual targets revealed expression of classical guidance ligands and receptors of the Semaphorin, Slit, Ephrin, Netrin and cell adhesion molecule (CAM) families (Fig. 2a), mostly described for their guidance role of navigating axons during development. Besides, some guidance molecules play a physiological role in the adult CNS, such as synapse functioning^{35–37}. Very interestingly, our datasets revealed the presence of 11 guidance ligands and 13 associated receptors (thereafter designated as “guidance factors”) in primary visual targets of the intact adult brain. (Fig. 2a, b).

Among the 12 proteins detected in all targets, some are permissive to axon growth and guidance such as the immunoglobulin cell adhesion molecules NCAM1 known to induce neurite growth²³, and NCAM2 recently shown to be required for growth cone formation^{38,39}. Using immunofluorescence on mature brain sections, we found that NCAM1 is mostly expressed around GFAP+ astrocytes and NeuN+ neurons (Fig. 2c, d, d’) depending on the brain region. Other examples of adhesion proteins include members of the synaptic cell adhesion molecule family CADM1, CADM2, CADM3 and CADM4 were also identified in all targets (Supplementary Fig. 2b). These cell adhesion molecules were demonstrated to be involved in axon pathfinding, in particular for midline crossing during development⁴⁰.

Furthermore, we found molecules that are repulsive, such as Ephrin-B3 (Efnb3) detected in all visual targets (Fig. 2a, e, e’). Ephrin-B3 has been described for its role as a repulsive midline barrier for many ipsilateral axons in the developing spinal cord⁴¹. Interestingly, some guidance ligands were detected only in specific targets. This is the case for the repulsive guidance cue Sema4D in the chiasm, the dLGN and the SCOL (Fig. 2a). We verified this result by immunofluorescence and found that Sema4D is highly expressed in the chiasm, accumulated by Olig2+ oligodendrocytes, whereas the SCN does not express it (Fig. 2c, f, f’). In addition, we found expression of Ephrin-B3, Sema4D and Sema7A associated with NeuN+ cells in the LGN (Fig. 2e’, f’, g’), which is the case of many guidance cues in the brain targets (Fig. 2c).

In our study, we detected 55 proteins of the extracellular matrix (ECM) (Supplementary Data 2 and 3, Supplementary Fig. 2c), including collagens and proteoglycans. For example, we found expression of CSPG4, which inhibits axon growth *in vitro*⁴², although it is yet unclear whether NG2-expressing cells, a major cellular component of the glial scar, provides in fact a stabilized substrate to support axon growth after spinal cord injury⁴³. We validated CSPG4 expression in the dLGN and vLGN, where CSPG4 accumulates in the extra-neuronal space (Fig. 2c, h, h’). Together, our datasets highlight the rich ECM environment of the target regions of RGC axons, which is of particular relevance to a context of axon growth and guidance.

Finally, we analysed proteins related to axonogenesis, axon extension, cytoskeleton, growth cone and axon guidance, a subset of proteins that we termed axon growth and guidance. We found expression of 112 proteins, including canonical guidance receptors of the Eph, Neuropilin, Plexin and Robo families (Supplementary Data 3, Fig. 2b, Supplementary Fig. 2d). We also found the protein doublecortin-like kinase 2 (DCLK2) expressed in NeuN+ cells of all visual targets (Supplementary Fig. 2e, f). DCLK2 was recently shown to

promote axon growth via induction of growth cone reformation⁴⁴, an essential step for the axon to interact with its environment and to respond to guidance cues.

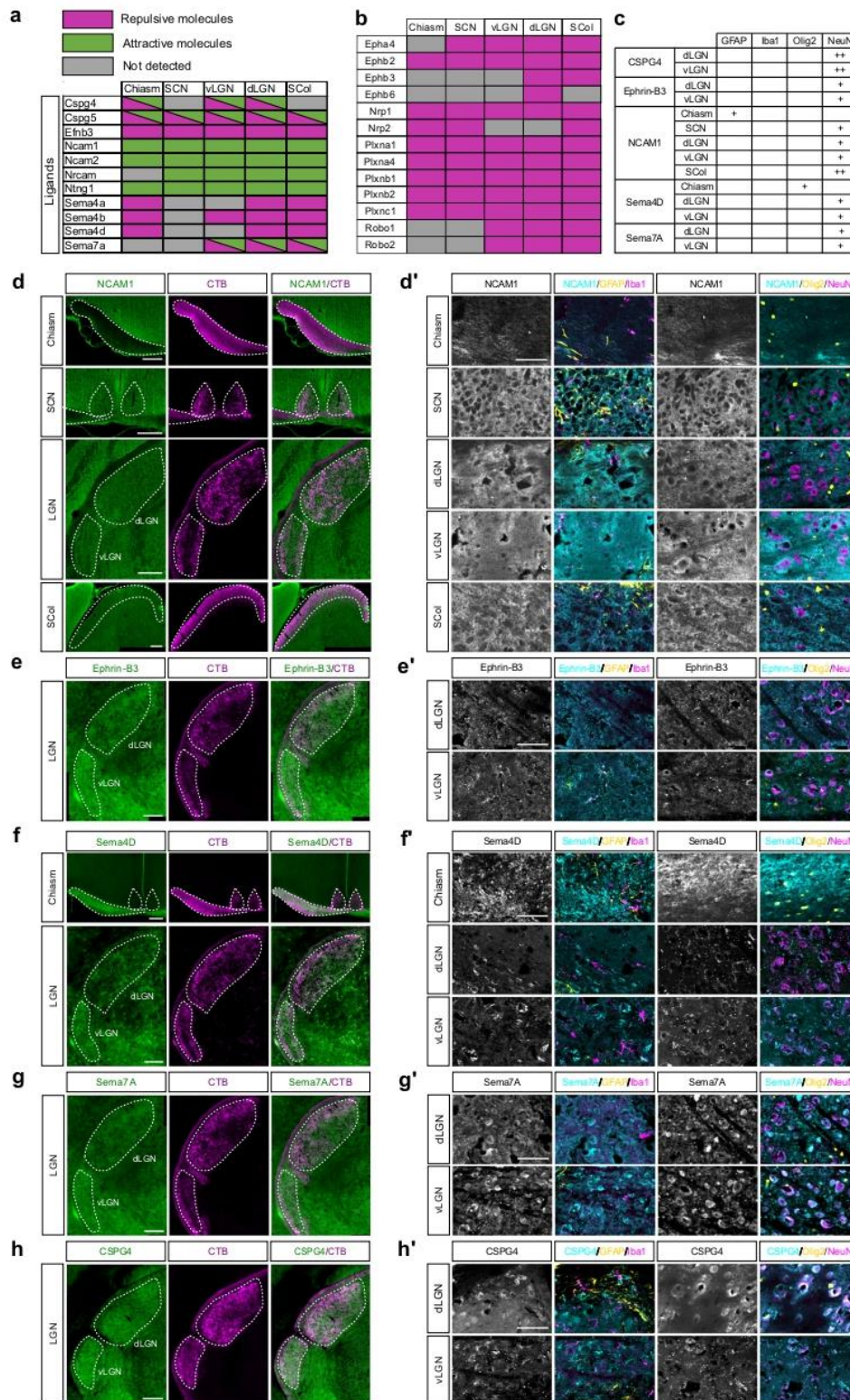
Optic nerve injury modulates the proteome of the visual targets

In order to understand the influence of the injury on the proteomes of visual targets, we performed bilateral optic nerve crush in adult (6 week-old) mice (Fig. 3a). This lesion leads to a full degeneration of RGC axons (Fig. 3b), resulting in loss of connection between the eye and the visual targets. We collected the brain targets four weeks later, at a time point when regenerative axons potentially reach the visual target regions in long-distance regeneration models^{3,4}. Biological replicates of the injured condition showed high consistency, as shown by the scatterplots of protein abundances (Supplementary Fig. 3). For each brain target, principal component analysis (PCA) showed clustering of replicates mainly depending on the condition (Supplementary Fig. 4a–e).

Very interestingly, injury leads to modification of the visual targets’ proteomes (Supplementary Data 4, Fig. 3c–g, Supplementary Fig. 4f–j). While most studies have highlighted injury-induced changes in lesioned neurons themselves or at the lesion site, here we unravel differences in protein expression in targets that are anatomically far from the injury site. Focusing on the chiasm, our datasets reveal a high number of differentially expressed proteins (311), among which 165 are upregulated and 146 are downregulated after the injury (Supplementary Data 4, Fig. 3c, Supplementary Fig. 4f). Interestingly, proteins upregulated after injury are associated with cell adhesion and extracellular matrix (eg upregulation of Galectin-3 (Lgals3) and of Fibromodulin (Fmod)) (Fig. 3c, h), supporting the hypothesis of a remodeling of the extracellular environment of the intermediate target after injury. On the other hand, proteins downregulated include Synaptotagmin-2 (Synt2) and Exportin-T (Xpot), which are associated with synapse and transport (Fig. 3c, h). This finding is consistent with the alteration of the axonal features 28 days post-crush.

In the visual targets (SCN, vLGN, dLGN and SCOL), we found smaller numbers of differentially expressed proteins (Fig. 3d–g, Supplementary Fig. 4g–j). DAVID analysis allowed us to highlight a robust enrichment of terms related to inflammatory response and to collagen in the list of proteins upregulated in the vLGN (Fig. 4e, h). The local changes in inflammatory proteins observed in these distal targets (upregulation of Complement C1q subcomponents (C1QA, C1QB, C1QC)) may be a consequence of RGC axon degeneration (glial activation, debris clearing) or may reflect the protein remodeling of the targets themselves in response to the injury. Conversely, we found a downregulation of structural components of the axon, for example the microtubule-associated protein tau (MAPT) involved in the stability of microtubules in the axon (Fig. 4e, h).

Interestingly, our proteomic analysis also revealed that the regulation of protein expression is dependent on the target itself. For example, we found that the ECM glycoprotein Tenascin-C is unchanged in the chiasm after optic nerve injury, while downregulated in the SCN, as confirmed by Western blot analysis (Fig. 3i). Tenascin-C displays bidirectional activity during development, depending on neuronal subtypes and integrin receptor expression⁴⁵. Its upregulation in the glial scar following CNS injury seems to be associated with a growth-promoting, integrin-dependent activity^{46,47}. Conversely, we found an upregulation of GFAP in the chiasm after optic nerve injury, while its expression is not changed in the SCN, as confirmed by immunofluorescence (Fig. 3j). GFAP is a marker of reactive astrocytes that reflects pathological conditions⁴⁸. Altogether, these results suggest that brain targets respond to axon injury even at a distance from the lesion. These modifications reveal that the adult brain is a dynamic environment and that there is some specificity among the different brain regions. These changes influence the capacity of regenerative



axons to resume developmental processes to reconnect their proper target.

Expression of guidance molecules remains steady in the brain after injury but is developmentally regulated

In most models of regeneration, only few axons are observed to enter the brain targets⁴. Our hypothesis is that the presence of guidance

molecules in the adult visual system interferes with the navigation of regenerating axons, preventing them to reconnect their proper brain target. While our data show that injury modulates the expression of several proteins even in distal targets of the visual system, it reveals no difference in expression level of guidance factors (Fig. 4a–e). These results were confirmed by Western Blot analysis for several examples in all target regions (Fig. 4f–j). They show that the optic nerve injury

Fig. 2 | Validation of proteomic analysis. **a** Table representing the detection (green for attractive molecules, magenta for repulsive molecules) or the absence of detection (grey) of guidance ligands in each brain target. **b** Table representing the detection (green for attractive molecules, magenta for repulsive molecules) or the absence of detection (grey) of guidance receptors in each brain target. **c** Table summarizing the type of cells expressing the guidance molecules of interest. **d** Epifluorescence images of NCAM1 immunofluorescent labelling in the adult chiasm, SCN, LGN and SCol (co-labelled with CTB). **d'** Confocal images of NCAM1 and different cell populations markers (GFAP, Iba1, Olig2, NeuN) in the adult intact chiasm, SCN, dLGN, vLGN and SCol. **e** Epifluorescence images of Ephrin-B3 immunofluorescent labelling in the adult LGN (co-labelled with CTB). **e'** Confocal images of Ephrin-B3 and different cell populations markers (GFAP, Iba1, Olig2,

NeuN) in the adult intact dLGN and vLGN. **f** Epifluorescence images of Sema4D immunofluorescent labelling in the adult chiasm and LGN (co-labelled with CTB). **f'** Confocal images of Sema4D and different cell populations markers (GFAP, Iba1, Olig2, NeuN) in the adult intact chiasm, dLGN and vLGN. **g** Epifluorescence images of Sema7A immunofluorescent labelling in the adult intact LGN (co-labelled with CTB). **g'** Confocal images of Sema7A and different cell populations markers (GFAP, Iba1, Olig2 and NeuN) in the adult intact dLGN and vLGN. **h** Epifluorescence images of CSPG4 immunofluorescent labelling in the adult intact LGN (co-labelled with CTB). **h'** Confocal images of CSPG4 and different cell populations markers (GFAP, Iba1, Olig2 and NeuN) in the adult intact dLGN and vLGN. **d, e, f, g, h** scale bar: 200 μm . **d', e', f', g', h'** scale bar: 50 μm . All images are representative of $N = 3$ biologically independent animals.

does not modify the guidance landscape of the distal choice point (the optic chiasm) and brain targets. This suggests that guidance factors are stably expressed in the mature brain and may contribute to the guidance defects observed during axon regeneration.

We then wondered whether establishment of this guidance map is concomitant with the initial innervation of the target regions during development. We focused on the dLGN as a proof-of-concept, as its development and innervation and maturation have been thoroughly studied⁴⁹. We looked at different time points of its innervation by RGC axons. To track dLGN innervation during development, we injected CTB555 in one eye of mice from E15.5 to P14 (Fig. 5a). Contralateral RGC axons enter the dLGN between E16 and P0, while ipsilateral RGC axons enter between P0 and P2, with synapse refinement and eye-specific segregation of innervation territories happening at eye opening (around P12)⁵⁰.

We looked at the dynamics of expression of different families of guidance molecules in the dLGN throughout development, that were detected in the adult dLGN in our analysis (Fig. 5b–f and Supplementary Fig. 4a, b). Using immunofluorescence and Western blot quantitative analysis, we found that each guidance cue displays a dynamic regulation of expression over the time of circuit formation. In particular for CSPG4 and Ephrin-B3, known to have a repulsive guidance activity, we observed that their level of expression is low at early stage of development (up to P2 for CSPG4 and up to P10 Ephrin-B3) (Fig. 5b, f). For CSPG4, expression gradually increases at times of synaptogenesis and circuit refinement (around P6) and stabilizes at times of visually-evoked activity (around P14) (Fig. 5b, Supplementary Fig. 5a, b). For Ephrin-B3, expression was undetected before P10, then it increases at times of circuit consolidation and visually-evoked activity (around P14) (Fig. 5f, Supplementary Fig. 5a, b). The cell adhesion molecule NCAM1 known to induce neurite growth²³ shows gradual increase at the time of dLGN innervation in the mouse embryo (E16 to P2). Then NCAM1 shows a progressive decrease until stabilization from P6 and throughout adulthood (Fig. 5c, Supplementary Fig. 5a, b). The gradual increase of Sema7A in the developing dLGN (Fig. 5e, Supplementary Fig. 5a, b) is also consistent with what was observed during neuronal circuit formation in multiple CNS regions⁵¹. In adult, Sema7A stabilized expression may play a role in neuroglia interactions and plasticity⁵².

In contrast, we found that the adult guidance maps in the dLGN are not modified after optic nerve injury. For the candidate molecules analyzed above, we quantified their expression level by Western blot and found no significant difference in intact versus injured conditions (Supplementary Fig. 5c–d), which confirms our MS-based proteomic results. In the context of adult regeneration, our analysis of developmental stages supports the idea that guidance factors are dynamically regulated during circuit formation – particularly during innervation of the functional targets. In adult, the fact that guidance factors are unchanged upon optic nerve injury correlates with the failure of reinnervation of visual targets by regenerating axons. Our analysis provides a comprehensive map of guidance cues expression in the mature visual system (Fig. 6). This brings up the possibility that a tight

spatio-temporal regulation of axon guidance processes in adult should control regenerative axons navigation to their proper targets to resume neuronal functions.

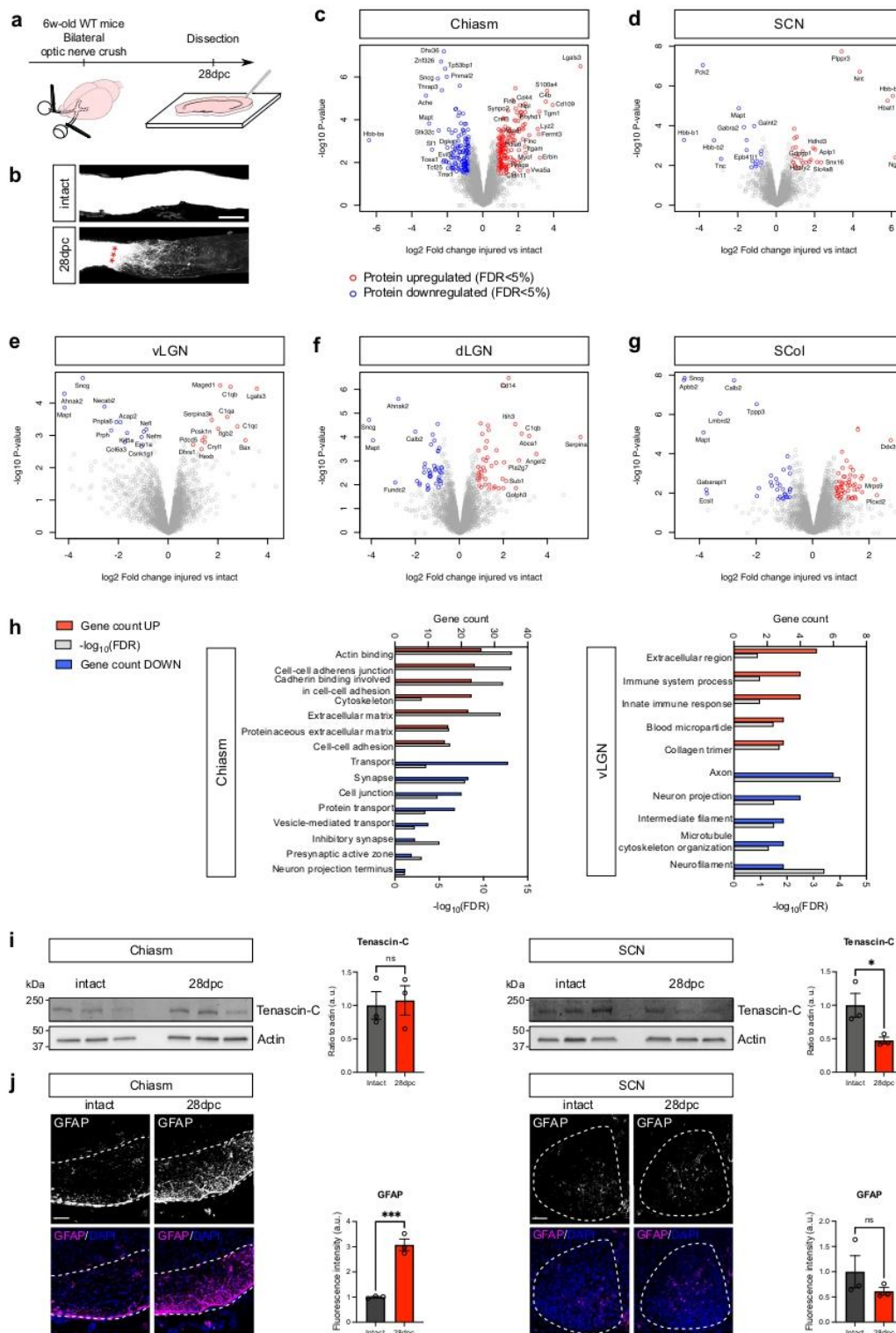
Mature regenerative RGC axons have the machinery to integrate guidance signaling

Based on our description of the guidance landscape in the mature brain, we then asked whether RGC had the potential to integrate and respond to these signals. Therefore, we analyzed the expression of corresponding guidance receptors in RGC. To this end, we used available transcriptomic datasets of two recent single-cell studies^{53,54} and of two regenerative models: co-activation of mTOR and JAK/STAT pathways⁵⁵ and overexpression of Sox11⁵⁶. Using our map of guidance ligands expressed in mature visual targets (Fig. 2a), we explored expression of the corresponding guidance receptors. We found that corresponding receptors are expressed in RGC both in intact WT condition and in regenerative (post-injury) condition. For example, the transcripts of Ephrin-B3 receptors *EphB2* and *EphA4* are expressed in RGC in intact and in regenerative (post-crush) conditions (Supplementary Fig. 6a). In the intact datasets, we highlighted the number of RGC clusters showing expression of the receptors of interest. For example, the transcript for the Sema4D receptor *PlxnB1* is detected in 27 out of 45 subpopulations of adult RGC (Supplementary Fig. 6a). In fact, despite compelling evidence of differential injury response of neuronal subpopulations^{54,57}, almost all RGC clusters express guidance receptors for CSPG family members, Ephrin-B3, NCAM1 and 2, Sema4D and Sema7A, suggesting that adult guidance response is shared by all RGC subpopulations.

Furthermore, we looked at the variation of axon guidance molecules between regenerative conditions and non-regenerative (WT) conditions following injury^{55,56}. Interestingly, some guidance receptors are dynamically regulated (either up or down) in the regenerative conditions, eg *Robo1* and *Plxnal* strongly upregulated compared to WT (Supplementary Fig. 6b). This suggests that regenerative RGC may modify their guidance response in these models. We also observed that some guidance receptors, such as *Epha7* and *Epha3*, vary in the opposite directions in the two regeneration models, probably due to the differences in pathway activation. Altogether, these observations account for the complexity of RGC guidance response that has to be considered to correct their misguidance.

Mature regenerative RGC axons respond to guidance cues

Next, we used the guidance map we generated (Fig. 6) to determine the guidance modalities in the mature brain. We focused on the optic chiasm, as a major intermediate target during circuit formation⁵⁸. We sought to determine the potential guidance role of two pairs of ligand/receptor: Ephrin-B3/EphA4^{59,60}, EphB2^{61,62}, and Sema4D/Plexin-B1 during midline crossing. Ephrin-B3 is repulsive to commissural axons during midline crossing of the developing spinal cord⁶² and acts as a growth-inhibitory barrier for regenerating axons at the lesion site⁶⁰. Sema4D has been reported to induce cell morphological changes notably growth cone collapse by interacting with Plexin-B1^{63,64} and



contributes to CNS regeneration failure at the lesion site⁶⁵. These features make these two candidates relevant to challenge to study axon guidance in the optic chiasm.

First, we verified their expression by immunostaining on chiasm sections (Fig. 7a). We found that Ephrin-B3 and Sema4D are expressed in the chiasm, which makes these factors relevant for the question of chiasm entering and midline crossing. We used in situ hybridization to

confirm *Epha4*, *Eph2* and *Plexin-B1* expression in the RGC layer of retina sections of wild-type mice, and in *PTEN/SOCS3*-co-deleted RGC at 3 days and 28 days after injury (Fig. 7b). Additionally, we used immunofluorescence to label the expression of these receptors in individual growth cones of RGC axons from adult retina explant cultures (Fig. 7c). Our results suggest that mature axons have the tools to interact with guidance cues and integrate their signal.

Fig. 3 | Optic nerve crush causes modifications in the proteome of adult visual targets. **a** Experimental design and timeline. 6 week-old mice underwent bilateral optic nerve crush and brains were dissected 28 days after the injury (28 dpc). **b** Cleared optic nerve labelled with CTB-Alexa555 in intact and injured conditions, allows to verify the efficiency of optic nerve crush. Red stars indicate the injury site. Scale bar: 100 μ m. Data are representative of $N = 4$ biologically independent animals. **c–g** Volcano plots showing differentially expressed proteins in the optic chiasm, SCN, vLGN, dLGN and SCol in injured versus intact conditions. Samples from visual targets at 28 days post-crush (28 dpc) were compared with the intact condition by MS-based label-free quantitative proteomics, using four biological replicates for each condition. The injury leads to modifications of the proteome of the visual targets, with 311 proteins found differentially expressed in the optic chiasm, 45 in the SCN, 26 in the vLGN, 92 in the dLGN and 92 in the SCol. Statistical testing was conducted using limma test. Differentially-expressed proteins were sorted out using a \log_2 (fold change) cut-off of 0.8 and a p -value cut-off allowing to reach a FDR inferior to 5% according to the Benjamini-Hochberg procedure. **h** GO terms (DAVID analysis) associated with lesion-modulated hits in the optic chiasm

and in the vLGN. In red is represented the protein count of the corresponding GO for up-regulated proteins. In blue is represented the protein count of the corresponding GO for down-regulated proteins. In grey is represented the significance as $-\log_{10}(\text{FDR})$. **i** Western blot analysis of Tenascin-C expression on independent biological replicates for intact and 28dpc optic chiasm and SCN (left) and corresponding quantification (right). Each lane corresponds to tissue collected from one animal. For each sample, protein expression is quantified by pixel densitometry relative to actin and normalized to intact condition. $N = 3$ biologically independent animals. Data are presented as mean values \pm SEM. Two-tailed unpaired Student's t -tests, ns: not significant, * p -value = 0.0464, ns: not significant. **j** Epifluorescence images of immunofluorescent labelling on coronal brain section showing the modulation of GFAP expression in the optic chiasm and not in the SCN in intact and injured conditions (left) with corresponding quantification (right). Scale bar: 50 μ m. $N = 3$ biologically independent animals. Data are presented as mean values \pm SEM. Two-tailed unpaired Student's t -tests, ns: not significant, ** p -value = 0.0009, ns: not significant. Source data are provided as a Source Data file.

To address axon responsiveness to these guidance cues, we combined the ex vivo system of culture of adult retina explants⁶⁶ with a stripe assay⁶⁷ (Fig. 7d). This type of assay has been originally used to characterize the guidance properties of developing neurons to various extracellular matrix proteins, short-range cues and cell adhesion molecules. Silicon matrices are used to create a striped pattern of substrates on which explants are plated. In our experiment, we assessed the preferential outgrowth of adult RGC axons on a guidance cue fused to Fc fragment versus Fc only (Fig. 7e). The preference was quantified as the number of outgrowth points in the alternating stripes.

In the control condition, many axons grow out of the explant with no preference on the stripes. In contrast, for Ephrin-B3- and Sema4D-coated stripes, we found that adult RGC axons tend to avoid Ephrin-B3-positive stripes and Sema4D-positive stripes, while outgrowing preferentially on Fc-stripes alone (Fig. 7e). Moreover, there are fewer and shorter axons in these conditions, further highlighting the repulsive effect of these cues. As a control of specificity, we found that the guidance cue Sema7A is neutral to adult RGC outgrowth (Fig. 7e), despite expression of its receptor Plexin-C1^{51,68} in growth cones ex vivo and in RGC in vivo (Fig. 7b, c). Together, these ex vivo data show that adult RGC axons are able to integrate Ephrin-B3 and Sema4D signaling and to respond to these cues.

Ephrin-B3 and Sema4D control midline crossing of regenerating axons in the mature chiasm

Ephrin-B3 and Sema4D are expressed in the chiasm and adult RGC axons respond to these cues. We then sought to determine whether modulation of the guidance signaling could impact midline crossing of regenerating axons in vivo. To this end, we used a silencing approach of the guidance receptors, by targeting the receptors of Ephrin-B3 and Sema4D with shRNA – EphA4/EphB2, and Plexin-B1, respectively. For each shRNA, we verified the silencing in vivo using in situ hybridization on adult retina sections (Supplementary Fig. 7a).

We first analyzed the outcome of inhibition of these receptors in wild-type condition. To do so, we injected intravitreally an AAV expressing shRNA scrambled (sh scrambled), sh EphA4, sh EphB2 or sh Plexin-B1 (Supplementary Fig. 7b). In control condition (AAV-sh scrambled), no regeneration is observed 14 days after optic nerve injury (Supplementary Fig. 7c). Interestingly, we found that both the combination of sh EphB2 and sh EphA4, and the sh Plexin-B1 had a significant effect on regeneration, as quantified by the number of regenerative axons (Supplementary Fig. 7c). Regarding Ephrin-B3 signaling, this result is consistent with the regenerative phenotype observed in Ephrin-B3-null mice both in the optic nerve and in the spinal cord⁶⁹, as well as with the enhanced regenerative effect in EphA4-null mice in the optic nerve⁷⁰. This experiment shows that it is

necessary to overcome the barrier to axon growth at the lesion site itself, a phenomenon widely studied in various CNS injury models.

Next, we assessed axon guidance at the optic chiasm by combining the guidance receptor silencing approach with a long-distance regeneration model through the co-activation of mTOR and JAK/STAT pathways in RGC⁵⁵. In this model, regenerative axons reach the optic chiasm at 28 days post-crush (28dpc). Here, we injected the AAV2 expressing the shRNA against the receptor (or sh scrambled as a control) in one eye of 3 week-old Pten^{fl/fl} SOCS3^{fl/fl} mice (Fig. 8a). Then one week later, we activated the pro-regenerative pathways by injecting AAV2-Cre recombinase and AAV2-CNTF in the same eye. We performed optic nerve injury two weeks later. We then assessed the regeneration extent and the effect on midline crossing at 28 days post-crush by injecting cholera toxin B in the regenerative eye. Our results show that, while the number of regenerative axons (reaching the distal part of the regenerating optic nerve) is unchanged by receptor silencing, their trajectory when entering the chiasm is modified. Both EphA4/EphB2 and Plexin-B1 silencing led to a higher number of axons crossing the midline, and a higher number of axons into the optic chiasm, compared to sh scrambled condition (Fig. 8b).

Altogether, our results show that i) adult regenerative RGC axons are able to respond to Ephrin-B3 and Sema4D signaling in vivo; and ii) these cues alter chiasm entering and midline crossing.

Discussion

Recent advances in the field of CNS regeneration have led to long-distance regeneration^{3,4,44,55,71}. Yet, this achievement comes with an unexpected drawback as most regenerative axons are misguided away from their proper targets, counteracting any attempt of functional recovery^{3,4,55}. This brings out axon guidance as a key process in the adult CNS to rebuild a functional circuit following injury. As of today, there are few data regarding axon guidance in the mature brain, and many questions regarding the potential and relevance of guiding axons following injury remain. In the present study, we performed extensive proteomic characterization of the optic chiasm and of the key brain targets receiving RGC inputs. We demonstrated that axon guidance modalities are still active in adult. We generated a comprehensive map of guidance cues expression in the visual system (Fig. 6) that explains guidance defects widely observed during regeneration. As a proof-of-concept, we manipulated two guidance signalings identified from our screen: Ephrin-B3 and Sema4D. Thereby, we showed that these cues are essential for regenerating axons to enter the chiasm and to cross the midline in the optic chiasm. Altogether, our results highlight that mature axons can be guided to control their navigation. In the context of regeneration, this feature is essential to form a functional circuit.

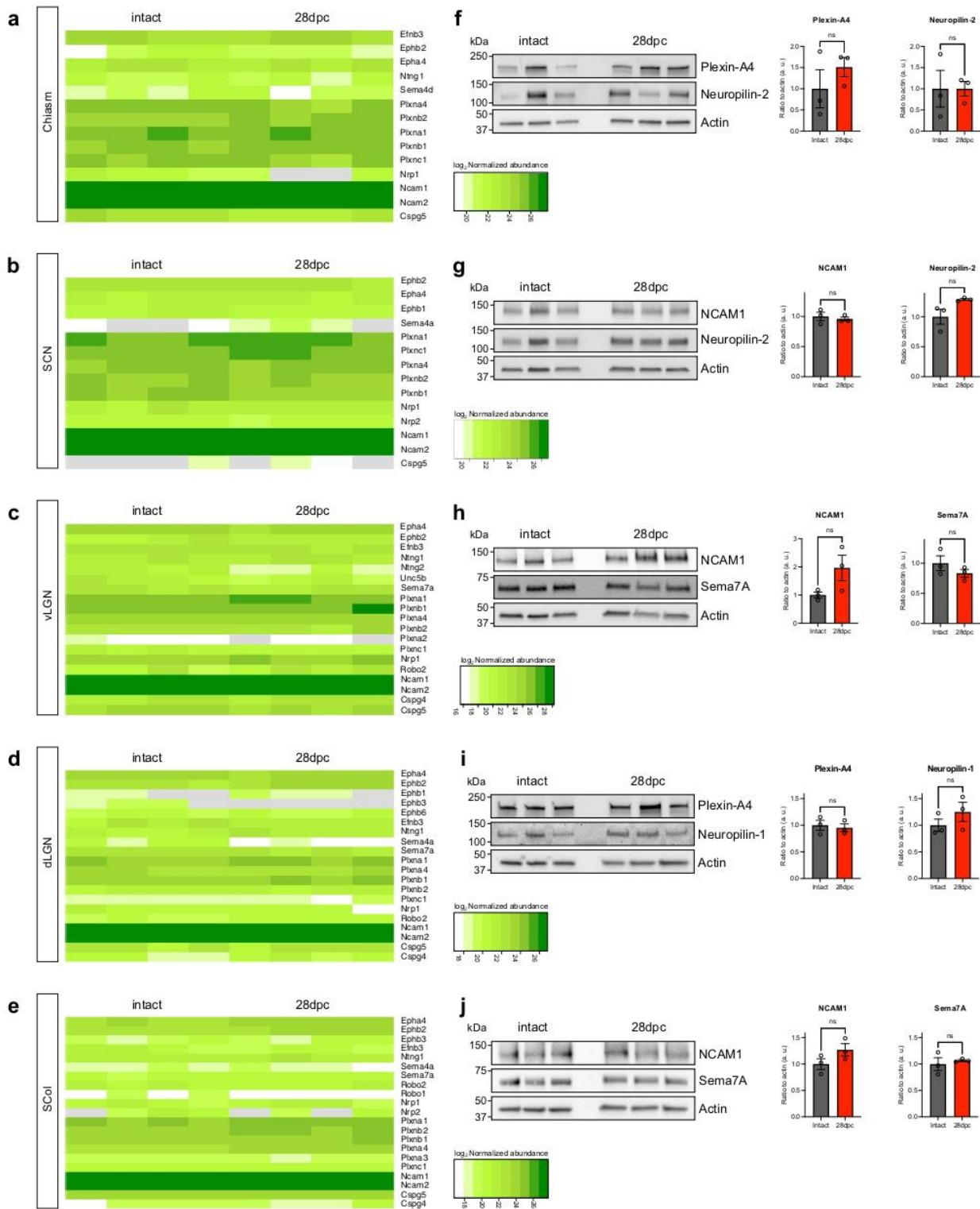


Fig. 4 | Expression of guidance and guidance-associated factors remains steady in the adult brain visual targets after optic nerve injury. a–e Heatmaps showing protein expression levels (\log_2 Normalized abundance) in all replicates of intact and injured (crush) conditions. **f–j** Western blot analysis of selected proteins in independent biological replicates of each visual targets (left) and corresponding

quantification (right). Each lane corresponds to tissue collected from one animal. For each sample, protein expression is quantified by pixel densitometry relative to actin and normalized to intact condition. $N = 3$ biologically independent animals. Data are presented as mean values \pm SEM. Two-tailed unpaired Student's t -tests, ns: not significant. Source data are provided as a Source Data file.

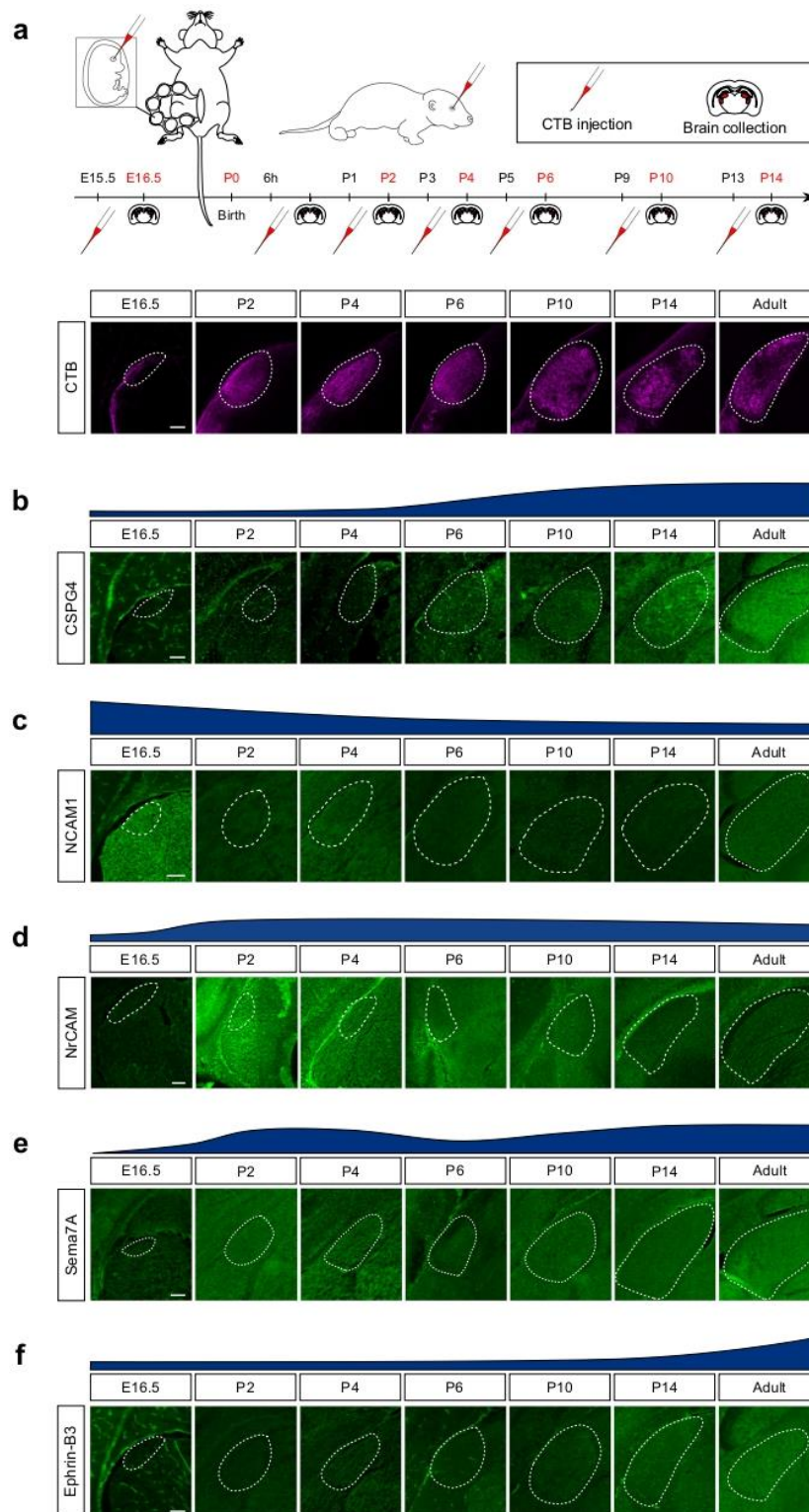


Fig. 5 | The guidance map is established during innervation of the developing visual target regions. **a** Schematic drawing showing in utero injection of mouse embryo eye at E15.5 and postnatal eye injection. Experimental design and timeline, and representative epifluorescent images of CTB-labelled dLGN at the different time points. For P2 to P14 time-points: one day before sample collection, one eye of mouse pups was injected intravitreally with CTB-555. For P0 time-point: 6 h before

sample collection, one eye of mouse pups was injected intravitreally with CTB-555. **b-f** Epifluorescent images of immunofluorescent labelling of **b** CSPG4, **c** NCAM1, **d** NrCAM, **e** Sema7A and **f** Ephrin-B3 in the developing dLGN (co-labelled with CTB, marked with white dashed lines on coronal sections). Scale bar: 100 μ m. All images are representative of $N=3$ biologically independent animals.

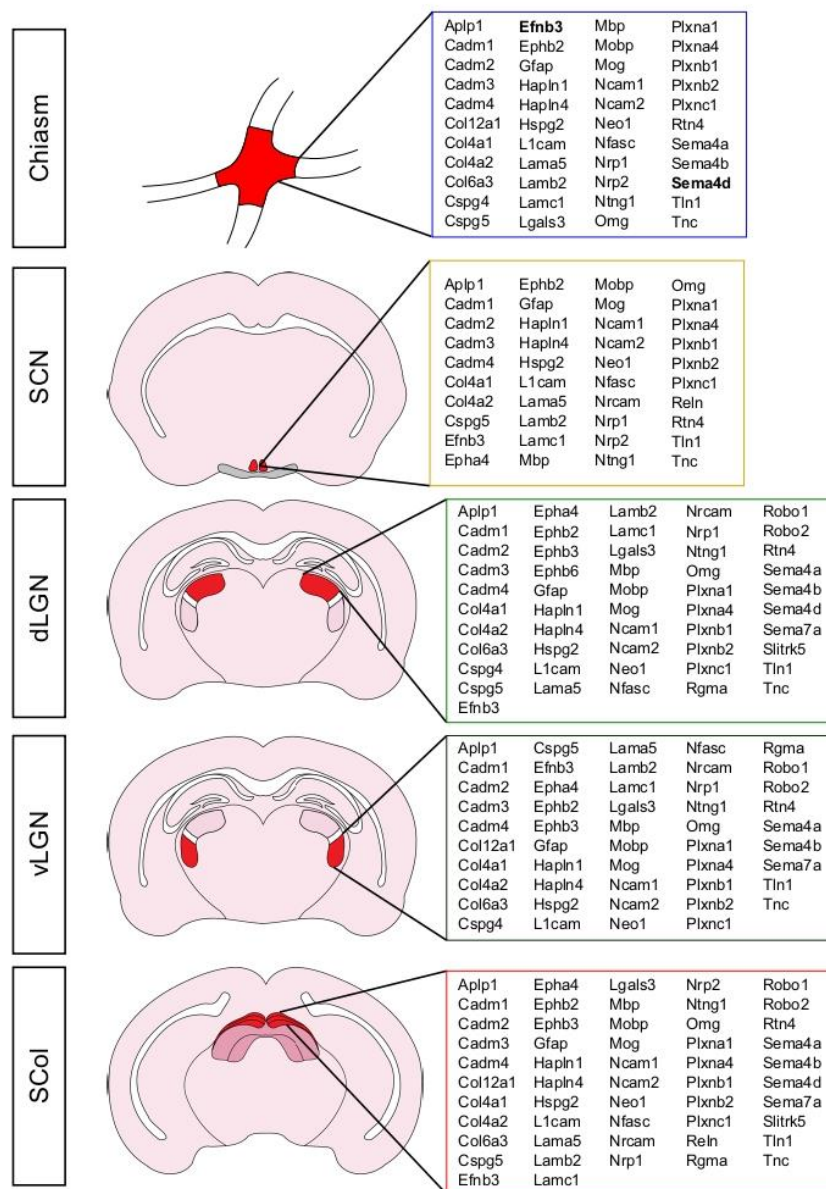
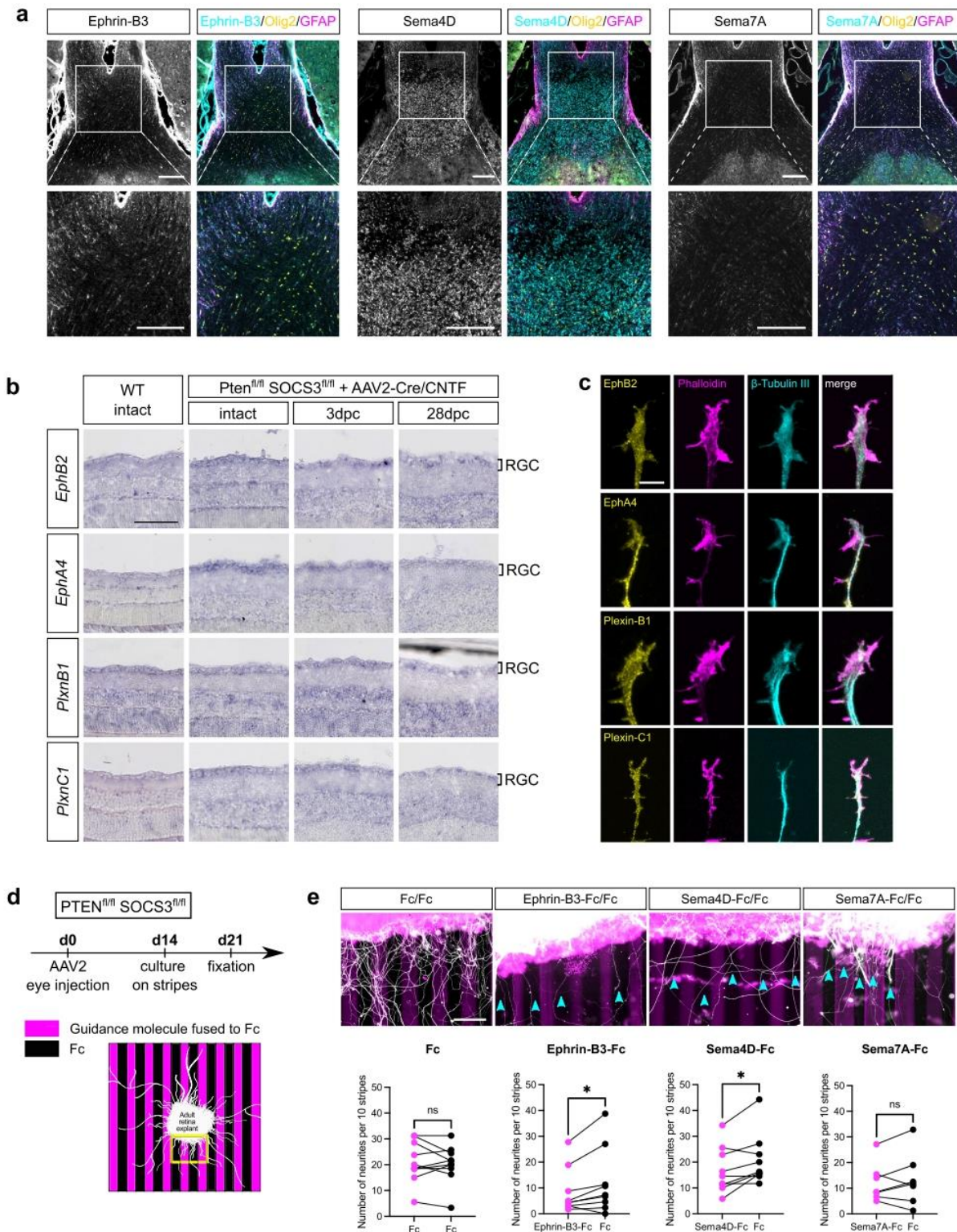


Fig. 6 | Guidance maps in the adult brain targets are set during development and provide insight into the guidance defects encountered by mature regenerative axons. Summary of guidance maps as described in the present proteomic

study for each brain target of the adult visual system. Proteins of interest are in bold. SCN suprachiasmatic nucleus, LGN lateral geniculate nucleus, v, ventral, d, dorsal, SCol superior colliculus.

Axon guidance is a process extensively studied during development⁷², particularly at intermediate targets, such as the floorplate in the spinal cord⁷³ or the optic chiasm in the visual system⁷⁴. In the mature nervous system, guidance process may not be required anymore, as the circuits have reached a steady state where axon growth is very limited. Some guidance cues have been involved in other processes, such as plasticity and regulation of synaptic activity^{35–37}. However, the comprehensive map of their expression and regulation in the adult brain is not known, and neither is their potential for guidance activity on adult regenerating axons. In this study, we conducted a proteomic analysis on the mature visual system, with a particular focus on expression of guidance cues and guidance-associated factors involved in axon pathfinding. We found that several proteins are expressed by all targets, reflective of the shared guidance signature of RGC targets (eg CSPG5, NCAM1 and 2, members of the Plexin family). Most guidance cues are associated with neurons, as

we showed for NCAM1 or CSPG4. Other studies addressing the changes within the LGN during development have shown that these molecules are also associated with neurons and more precisely with perineuronal nets (PNN)³¹. In our case, the pattern of expression suggests that guidance cues may be associated with PNN. Interestingly, we found that Sema4D expression is associated with oligodendrocytes, as previously reported^{65,75}. Moreover, depending on the brain regions, some cues are associated with one or another cell type. For example, NCAM1 is associated with GFAP+ astrocytes in the chiasma whereas it is expressed by neurons in the SCN, vLGN, dLGN and SCol. These results suggest that these cues may have different functions depending on the brain region and their source. Indeed, cell adhesion molecules have been shown to regulate axon fasciculation when expressed by neurons⁷⁶. Beside their role in adhesion, CAMs are also involved in modulating axonal response to guidance cues^{77,78}. Interestingly, during development, growth cones from pioneer axons interact with glia cells



at critical choice points⁷⁹ and CAM, specifically NCAM stands as one of the major effectors during this navigation⁸⁰. Thus, the expression of NCAM1 by astrocytes at the optic chiasm in the mature brain may be important for axon navigation during regeneration at the midline.

In the context of CNS regeneration, guidance cues have been mainly studied at the lesion site, where their upregulation upon injury correlates with axon growth inhibition^{26,65,69,81}. In contrast, their

regulation distal to the lesion site or along the axonal path has not been addressed. Thus, we compared their expression in intact condition versus bilateral optic nerve injury at 28dpc. Surprisingly, while we observed several protein expression changes in the targets of interest, the expression of guidance cues themselves was not affected by the removal of RGC afferences. These results suggest that injury signals are integrated by the brain nuclei and the optic chiasm, and that guidance

Fig. 7 | Axons respond to guidance factors ex vivo. **a** Epifluorescence images of immunofluorescent labelling of Ephrin-B3, Sema4D and Sema7A in transversal optic chiasm sections, with counter-staining of Olig2 and GFAP. Scale bar: 200 μ m. Images are representative of $N=3$ biologically independent animals. **b** In situ hybridization showing EphB2, EphA4, Plexin-B1 and Plexin-C1 expression in RGC of WT intact, PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl} intact, 3 days post-crush (3dpc) and 28 days post-crush (28dpc) retina infected with AAV2-Cre and AAV2-CNTF. Scale bar: 100 μ m. Images are representative of $N=4$ eyes. **c** Representative confocal immunofluorescence pictures showing expression of EphB2, EphA4, Plexin-B1 and Plexin-C1 in the growth cone of a PTEN^{-/-}/SOCS3^{-/-} RGC axon. Scalebar: 5 μ m. Images are representative of $N=3$ explants over one experiment. **d** Timeline and experimental design of the stripe assay. Yellow scare represents an example of region of interest

used for the quantification. 14 days after AAV2-Cre and AAV2-CNTF eye injection in PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl} mice, retina explants were cultured for 7 days on the stripes pattern containing a guidance molecule fused to Fc or Fc as a control. **e** Epifluorescence images of retina explants cultured on stripes containing Fc/Fc (as a control), Ephrin-B3-Fc/Fc, Sema4D-Fc/Fc and Sema7A-Fc/Fc with the corresponding quantification. Blue arrowheads highlight axons path. Fc/Fc: $N=10$ explants over two independent experiments. Ephrin-B3-Fc/Fc: $N=9$ explants over two independent experiments. Sema4D-Fc/Fc: $N=9$ explants over two independent experiments. Sema7A-Fc/Fc: $N=7$ explants over two independent experiments. Two-tailed paired t -tests, Ephrin-B3-Fc/Fc * p -value = 0.0343, Sema4D-Fc/Fc * p -value = 0.024, ns: not significant. Scale bar: 100 μ m. Source data are provided as a Source Data file.

cues expression is not affected by these changes. The analysis of the guidance map establishment during development of the dLGN supports the idea that guidance factors are dynamically regulated during circuit formation – particularly during innervation of the functional targets. In adult, the fact that guidance factors are unchanged upon optic nerve injury correlates with the failure of reinnervation of visual targets by regenerating axons. So, our analysis provides additional argument that, following injury, the adult CNS does not have the appropriate guidance map that is required for functional reconnection. This brings up the possibility that a tight spatio-temporal regulation of axon guidance processes in adult should allow axons to navigate correctly and enter the proper target to resume neuronal functions.

In our study, we also analyzed the injury response of the primary targets of the lesioned RGC axons. Previous transcriptomic work focused on gene expression changes in the superior colliculus in the course of development and following injury, based on mononuclear enucleation⁹². This study highlighted functional groups of genes regulated by the injury, including transport and metabolism. More recently, a transcriptomic profiling of the spinal cord target tissue after stroke allowed to highlight two phases of the target injury response: a primary phase characterized by the inflammatory response in the target area, and a secondary later phase characterized by secretion of connectivity-promoting growth factors⁹³. Such changes in the long-term might affect axon growth and guidance of regenerative axons and open a therapeutic window of modulation of gene expression to promote growth and synaptogenesis. Intriguingly, we uncovered protein expression changes after injury, even in distal targets. Multiple hypotheses arise here: i) target neurons that are not sustained anymore by RGC neuronal activity undergo protein expression changes; ii) molecular changes of the distal response may be intrinsic to these target neurons and possibly consequent to forward signalling of axonal injury; iii) axon degeneration down to the lesion site triggers a local inflammatory response which in turns causes injury response of the neuronal and non-neuronal cell populations with adaptation of protein expression. It is more expected that the latter is a transient response short to mid-term following the injury, as observed in the Wallerian degeneration model⁹⁴. In our case, four weeks after the injury, we expect that axon death and debris have been cleared by glial cells. Yet, sustained activation of the glia and activation of the immune system are a feature of CNS injury⁹⁵, consistent with the enrichment of immune response in the pool of upregulated proteins in several targets. Even if these events might not be involved in axon guidance, they should be considered when it comes to circuit formation, as they could interfere with synapse formation, maintenance or myelination of regenerative axons.

As guidance cues are still expressed all along the path of regenerating axons, we asked whether axon guidance is still functional in the mature brain. Our ex vivo experiments stress out that regenerating axons can respond to guidance signaling, that this response is specific and that it may be regulated over time. For example, one can hypothesize that regenerating axons do not respond to Sema7A at early

steps of their growth, but eventually acquire sensitivity to it. This type of regulation has been thoroughly described during development of the spinal cord, where growing commissural axons do not respond to Sema3B or Sema3F before crossing the floorplate, despite expressing the receptor Neuropilin-2⁹⁶. Only after reaching the midline do they become sensitive to these cues, as the Neuropilin-2 co-receptor Plexin-A1 is addressed to the membrane⁷⁸. Such mechanism may be at play in axon regeneration in the mature brain.

We then addressed in vivo axon growth and guidance during regeneration in adult. To this end, we focused on the optic chiasm as this region is a critical choice point²⁴, where many guidance defects are observed in long-distance regeneration models. In the intact visual circuit, 95% RGC axons cross the midline and 5% project ipsilaterally²⁴. During regeneration, many axons do not cross the midline and get lost in the optic chiasm^{10,55}. Here, we show that Ephrin-B3 and Sema4D are expressed in the optic chiasm and their corresponding receptors are expressed by RGC. These guidance cues have been described during the formation of the nervous system^{87–89}. In the context of the mature nervous system, they are associated with a decrease of axonal outgrowth and are considered as inhibitory for axon regeneration^{60,65,70,90}. Yet, their role as guidance cues of regenerating axons have not been addressed. Here, we combined a shRNA-based receptor-silencing approach with a long-distance regeneration model (mTOR/JAK-STAT activation⁵⁵). In this case, we observed a significant modification of regenerating axons pathfinding during midline crossing at the optic chiasm. While the ipsi- versus contralateral segregation is precisely described during development, this specification remains to be determined in regenerating adult axons. In our case, it is possible that the repulsive effect observed using our adult assay affects the majority of RGC axons, with no segregation of ipsi- versus contralateral projections. Further analyses will be critical to elucidate the behavior of axons of each RGC subpopulation, the extent of their ability to resume developmental pathfinding, and whether these rerouted axons are able to form stable synapses with their original targets to sustain functional recovery. Nonetheless, we here demonstrate the possibility to guide regenerating axons in vivo to repair a functional circuit.

Altogether, our datasets provide an unbiased extensive protein screen of primary visual targets of the adult CNS, in intact and injured conditions. While axon guidance has been quasi-exclusively studied during development so far, we demonstrate here that it is in fact at play in the adult system. In particular, our study shows that: i) guidance cues are expressed in the adult central nervous system; ii) their expression is not modified upon injury; and iii) adult regenerating axons are able to respond to these guidance cues. In sum, we provide a proof-of-concept that guidance in the adult is possible and particularly relevant in the context of regeneration. This essential process will set the building blocks of circuit repair in the injured adult visual system.

Methods

Mice

Wild-type (C57BL/6) embryos (E16.5), pups (P0, P2, P4, P6, P10, P14) and adult (6 to 10 week-old) mice were used in this study, regardless of

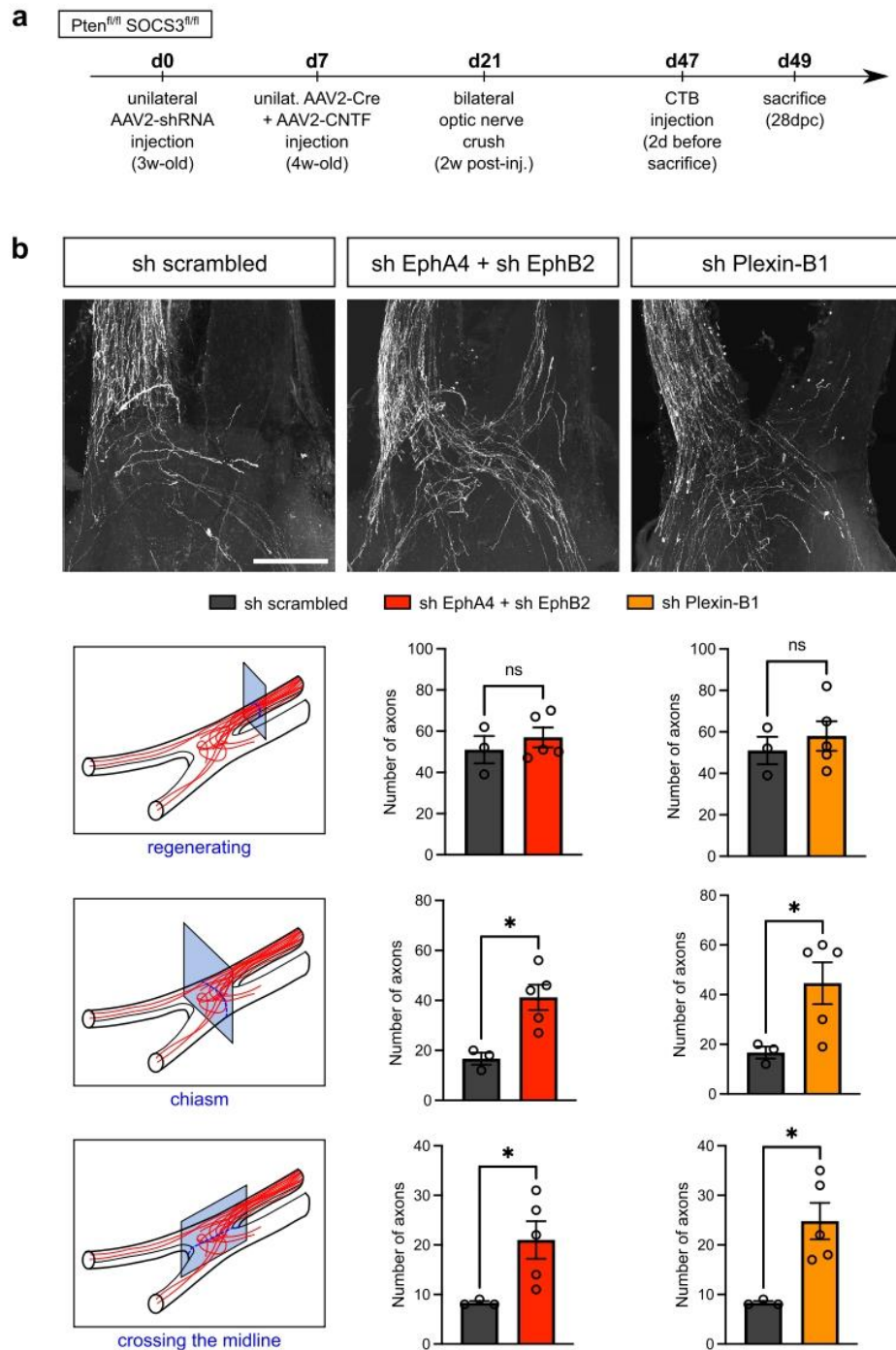


Fig. 8 | Receptor silencing induces a modification in pathfinding of regenerating axons in PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl} mice. **a** Timeline of the experiment. 3 week-old PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl} mice were first injected with shRNA EphA4+ shRNA EphB2 or shRNA-Plexin-B1 or shRNA scrambled. 7 days after, AAV2-Cre and AAV2-CNTF eye injections were performed. 2 weeks post-injection, mice undergone bilateral optic nerve crush and phenotypes were observed 28 days post-crush (28dpc). **b** Whole optic chiasm confocal images showing regenerative axons labelled with CTB in PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl} mice injected with AAV2-shRNA, and AAV2-Cre + AAV2-CNTF at 28dpc, with schematic of quantification planes and

corresponding quantification. Sh scrambled: *N* = 3 biologically independent animals. Sh EphA4 + sh EphB2: *N* = 5 biologically independent animals. Sh Plexin-B1: *N* = 5 biologically independent animals. Data are presented as mean values ± SEM. Entering the chiasm: two-tailed unpaired Student's *t*-tests, shEphA4+sh EphB2 vs sh scrambled **p*-value = 0.0129, sh Plexin-B1 vs sh scrambled **p*-value = 0.049. Crossing the midline: two-tailed unpaired Student's *t*-tests, shEphA4+sh EphB2 vs sh scrambled **p*-value = 0.0459, sh Plexin-B1 vs sh scrambled **p*-value = 0.0154. Scale bar: 250 μm. Source data are provided as a Source Data file.

sex. PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl} (C57BL/6 background) mice were used for culture and in vivo experiments. All the in vivo experiments were performed in accordance with our ethics protocol approved by the institution, local ethics committee and the French and European guidelines (APAFIS#9145-201612161701775v3 and APAFIS#26565-2020061613307385v3). The number of mice used in each experiment is specified in the corresponding figure legends.

Ethics statement

All animal care and procedures have been approved by the Ethics Committee of Grenoble Institut Neurosciences (project number 201612161701775) and by the French Ministry of Research (Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, project numbers APAFIS#9145-201612161701775v3 and APAFIS#26565-2020061613307385v3) in accordance with French and European guidelines.

Optic nerve crush injury

Optic nerve crush was performed according to ref. 66. Briefly, 6 week-old mice were anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (60–100 mg/kg) and xylazine (5–10 mg/kg). A mini bulldog serrefines clamp was placed to display the conjunctiva. The conjunctiva was incised lateral to the cornea. The refractor bulbi muscles were gently separated and the optic nerve was pinched with forceps (Dumont #5 FST) at 1 mm from the eyeball during 5s^{2,66}.

Intravitreal injection

Intravitreal CTB injection. One day before sample collection, mice were anesthetized as described above and intravitreal injections of CTB-555 (Cholera toxin subunit B, Alexa Fluor 555-conjugated, Thermo Fisher Scientific) were performed. The external edge of the eye was clamped using a mini bulldog serrefines clamp (FST) to display the conjunctiva. 1 µl of CTB-555 (1 mg/mL) was injected into the vitreous body using a glass micropipette connected to a Hamilton syringe^{2,66}.

Intravitreal AAV2 injection. Intravitreal Adeno-Associated Viruses of serotype 2 injections were performed as described above. For the PTEN SOCS regenerative model, AAV2 expressing the Cre recombinase (AAV2-Cre) and ciliary neurotrophic factor (AAV2-CNTF) were used. For the in vivo receptors' inhibition, the following AAV2 were injected: shRNA scrambled, shRNA Plexin-B1, shRNA EphB2, shRNA EphA4. The shRNA sequences are the following: shRNA scrambled GCTTAC-TAACCTCGGCAGT, shRNA Plexin-B1 GTATATCAACAAGTACTAT (Addgene, 115174)⁹¹, shRNA EphB2 GGACCTGTGTTATAACATCAT^{92,93}, shRNA EphA4 GCAGCACCATCATCCATTG⁹⁴.

Adult sample collection

Adult mice were subdivided into 2 groups: control (intact mice) and mice that underwent optic nerve injury. 10 week-old mice from both groups were anesthetized using isoflurane (Équipement Vétérinaire Minerve). After cervical dislocation, eyeballs and brains were dissected out. Using a vibratome (Leica VT1200S) 300 µm fresh brain sections were collected in ice-cold Hibernate A (Thermo Fisher Scientific). Chiasm, suprachiasmatic nucleus (SCN), ventral lateral geniculate nucleus (vLGN), dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) and superior colliculus (SCol) were micro-dissected under a binocular microscope (Zeiss SteREO Discovery.V8) and flash frozen in dry ice. Eyes of control mice were previously injected intravitreally with CTB-555 to facilitate detection of the visual targets.

Sample preparation

Total protein lysates were obtained by extraction in Laemmli 2x (4% SDS, 60 mM TrisHCl pH 6.8, 200 mM DL-Dithiothreitol) and 15 min incubation on ice. 0.5 µl of benzonase (Sigma-Aldrich) was added to each sample and incubated for 10 min at 37 °C to digest DNA. After

denaturation at 95 °C for 5 min, the protein concentration was determined using Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). To ensure sample quality and consistent quantification, a silver staining was performed by loading 1 µg of proteins onto a 4–15% precast gel (Biorad). After electrophoresis, silver staining of the proteins was performed using the Silver Quest Kit (Thermo Fisher Scientific).

MS-based proteomic analyses

Proteins from tissue preparations were solubilized in Laemmli buffer before being stacked in the top of a 4–12% NuPAGE gel (Life Technologies), stained with R-250 Coomassie blue (Bio-Rad) and in-gel digested using modified trypsin (sequencing grade, Promega) as previously described⁹⁵. The dried extracted peptides were resuspended in 5% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid and analyzed by online nanoliquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (Ultimate 3000 RSLCnano and the Q-Exactive HF, Thermo Fisher Scientific).

Chiasm and SCN samples. Peptides were sampled on a 300 µm 5 mm PepMap C18 precolumn (Thermo Fisher Scientific) and separated on a 75 µm 250 mm C18 column (Reprosil-Pur 120 C18-AQ, 1.9 µm, Dr. Maisch HPLC GmbH). The nano-LC method consisted of a 240 min multi-linear gradient at a flow rate of 300 nl/min, ranging from 5 to 33% acetonitrile in 0.1% formic acid.

dLGN, vLGN and SCol samples. Peptides were sampled on a 300 µm 5 mm PepMap C18 precolumn (Thermo Fisher Scientific) and separated on a 200 cm µPACTM column (PharmaFluidics, Ghent, Belgium). The nano-LC method consisted of a 360 min multi-linear gradient at a flow rate of 300 nl/min, ranging from 5 to 33% acetonitrile in 0.1% formic acid.

For all tissues, the spray voltage was set at 2 kV and the heated capillary was adjusted to 270 °C. Survey full-scan MS spectra ($m/z = 400–1600$) were acquired with a resolution of 60000 after the accumulation of 3×10^6 ions (maximum filling time 200 ms). The 20 most intense ions were fragmented by higher-energy collisional dissociation after the accumulation of 10^5 ions (maximum filling time: 50 ms). MS and MS/MS data were acquired using the software Xcalibur 4.0 with configured instrument Q Exactive HF - Orbitrap MS 2.9 (Thermo Scientific).

MS-based proteomic data processing

Data were processed automatically using Mascot Distiller software (version 2.7.1.0, Matrix Science). Peptides and proteins were identified using Mascot (version 2.6) through concomitant searches against Uniprot (Mus Musculus taxonomy, for Optic chiasm and SCN samples, downloaded in June 2019 with 87,573 entries, and for dLGN, vLGN and SCol samples, downloaded in August 2020 with 87,975 entries), a homemade database containing the sequences of classical contaminant proteins found in proteomic analyses (keratins, trypsin, bovine albumin, etc., 250 entries) and their corresponding reversed databases. Trypsin/P was chosen as the enzyme and two missed cleavages were allowed. Precursor and fragment mass error tolerances were set, respectively, to 10 ppm and 25 mmu. Peptide modifications allowed during the search were: carbamidomethylation (fixed), acetyl (protein N-terminal, variable) and oxidation (variable). The Proline software (version 2.0)⁹⁶ was used to merge either all intact brain targets together or intact and injured data together but for each brain target separately. After combination, results were filtered: conservation of rank 1 peptide-spectrum match (PSM) with a minimal length of 7 and a minimal score of 25. Peptide-spectrum matching (PSM) score filtering is then optimized to reach a False Discovery Rate (FDR) of PSM identification below 1% by employing the target decoy approach. A minimum of one specific peptide per identified protein group was set. For computing results of intact brain targets, Proline was used to

perform MS1-based label free quantification of the peptides and protein groups from the different samples without cross-assignment; protein abundances were computed as the sum of specific peptide abundances; for each tissue, an average iBAQ value³³ across replicates was then calculated. For producing quantitative results of intact brain targets *versus* injured ones, Proline was used to perform MS1-based label free quantification of the peptides and protein groups from the different samples with cross-assignment activated. After peptide abundances normalization, protein abundances were computed as a sum of specific peptide abundances.

Statistical analysis of mass spectrometry-based proteomic data

Statistical analysis was performed using ProStar⁹⁷ to determine differentially abundant proteins between intact and crushed conditions. Protein sets were filtered out if they were not identified in at least two replicates of one condition. Protein sets were then filtered out if they were not quantified across all replicates in at least one condition. Reverse protein sets and contaminants were also filtered out. After log₂ transformation, POV missing values were imputed with *slsa* method and MEC ones with 2.5-percentile value of each sample. Statistical testing was conducted using *limma* test. Differentially-expressed proteins were sorted out using a log₂(fold change) cut-off of 0.8 and a *p*-value cut-off allowing to reach a FDR inferior to 5% according to the Benjamini-Hochberg procedure. Only proteins identified with a minimum of two specific peptides were further considered.

Data analysis

Scatterplots. Scatterplots of protein hits were obtained by plotting the protein abundances across replicates of a same visual target region in either intact or injured conditions.

Gene Ontology analysis. Gene Ontology (GO) analysis was performed using DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) Bioinformatics Resources (version 6.8). Bubble plots were obtained by submitting the list of the 3000 more abundant proteins (ranked by iBAQ, see Supplementary Data 1) of each brain target to DAVID. GO terms were divided into 3 groups: Biological Processes (BP), Molecular Functions (MF) and Cellular Compartments (CC). The following parameters were used as cut-offs to represent bubble plots: gene count >50, fold enrichment >3 and *p*-value < 0.01.

Interactome analysis. To obtain the protein-protein interaction networks, the 200 more abundant proteins (ranked by iBAQ, see Supplementary Data 1) were submitted to STRING (version 11.0). High confidence interactions (minimum required interaction score 0.700) were plotted with hiding of disconnected nodes for ease of representation. Protein clustering was performed using the Markov Cluster Algorithm (MCL) with inflation parameter of 1.4. Highlighted clusters were manually annotated.

Venn diagrams. To perform a GO-based analysis of protein content, categories of interest were manually defined from the list of protein hits contained in offspring GO terms of "Extracellular matrix (GO:0031012)", "Cell-adhesion (GO:0007155)", "Axon guidance (GO:0007411)" and "Axonogenesis (GO:0007409)" (see Supplementary Data 2). For each category, protein hits contained in each brain region were sorted according to their detection in mass spectrometry.

PCA analysis. For each brain target, Principal Component Analysis (PCA) was performed to highlight biological differences between injured and intact conditions across replicates. Proteins undetected in more than 5 samples were filtered out. Samples were plotted according to the first and second components, with the percentage of variation indicated for each component.

Volcano plots. For each brain target, protein hits were plotted according to the *p*-value and the log₂ fold change in injured of differential expression between intact condition. Proteins with a FDR below 5% were highlighted.

Heatmaps. To analyse protein expression modulated by the injury (Supplementary Fig. 4), heatmaps were generated by plotting the difference between log₂ normalized abundance of each protein hit and the mean across all samples. For representation, proteins were selected according their fold change between injured and intact conditions (log₂ fold change >0.8) and the FDR-corrected *p*-value (FDR < 5% for all brain targets, except chiasm: FDR < 1% for ease of representation). To analyse protein expression of guidance proteins (Fig. 4), heatmaps were generated by plotting the normalized abundance across all replicates.

Data representation. Data analysis and representation were performed using R software for statistical computing (version 4.0.2).

Western blot

For each brain target, 5–10 µg protein were loaded on SDS-PAGE gels (4–15% acrylamide, Biorad) and subjected to electrophoresis. Proteins were then transferred onto a nitrocellulose membrane (Thermo Fisher Scientific). Proteins were stained with Ponceau red to control for the transfer and the loading. Membranes were blocked with Tris-buffered saline 0.05% Tween (TBS-T) containing 5% milk for 1 h at room temperature and probed with primary antibody diluted in blocking solution overnight at 4 °C. The following primary antibodies and dilutions were used: anti-NCAM1 (1:1000, Rabbit, Cell signalling Technology, #99746), anti-Tenascin-C (1:1000, Rabbit, Abcam, ab108930), anti-Sema7A (1:1000, Rabbit, Abcam, ab23578), anti-Neuropilin-1 (1:1000, Rabbit, Cell signalling Technology, #3725), anti-Neuropilin-2 (1:1000, Rabbit, Cell signalling Technology, #3366), anti-Plexin-A4 (1:1000, Rabbit, Cell signalling Technology, #3816), anti-Ephrin-B3 (1:500, Rabbit, Invitrogen, 34-3600), anti-CSPG4 (1:1000, Rabbit, Proteintech, 55027-1-AP), anti-NrCAM (1:1000, Rabbit, Abcam, ab24344), anti-actin (1:5000, Mouse, Sigma-Aldrich, a1978). Membranes were washed in TBS-T and probed with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:5000, anti-Rabbit, Proteintech; or 1:10000, anti-Mouse, ThermoFisher Scientific) for 1 h at room temperature. After several washes in TBS-T membranes were developed with ECL substrate (100 mM Tris-HCl pH 8.5, 0.5% coumaric acid, 0.5% luminol and 0.15% H₂O₂). Chemiluminescence signal was acquired using the ChemiDoc imaging system (Bio-Rad). The same membrane may be stripped and probed with different primary antibodies. Protein level was quantified with pixel densitometry and normalised to the level of actin. For each independent biological replicate, the pixel density of the protein of interest was normalized to the corresponding actin of the same samples. Data were normalized to intact condition. Bar graph data are represented as mean ± standard error of the mean (SEM). Individual values are plotted on each graph. Data were subjected to two-tailed unpaired Student's *t*-test for statistical analysis, using GraphPad Prism version 9.1.2. For Western blot visual representation, one membrane probed with actin may appear several times to illustrate the quantification. Uncropped and unprocessed scans of the blots are supplied in the Source Data file.

Transcriptomic datasets data screening

For the screen of gene expression in RGC, GEO datasets available on NCBI were used: atlas of neonatal (P5) RGC from single-cell transcriptomics analysis (accession number GSE115404⁵³); atlas of adult RGC from single-cell transcriptomics analysis (accession number GSE137400⁵⁴); microarray dataset comparing PTEN^{-/-} SOCS3^{-/-} RGC to WT RGC after optic nerve crush (accession number GSE32309⁵⁵); RNA-sequencing dataset comparing SoxII-overexpressing RGC to Plap-overexpressing (control) RGC after optic nerve crush (accession

number GSE87046⁵⁶). For single-cell transcriptomics analyses^{53,54}, online visualization tools were used to determine expression of genes of interest: <https://health.uconn.edu/neuroregeneration-lab/rgc-subtypes-gene-browser/> and https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell/study/SCP509/mouse-retinal-ganglion-cell-adult-atlas-and-optic-nerve-crush-time-series/. If the mean expression value was strictly positive, the gene was considered to be expressed in the corresponding cluster. For the microarray dataset⁵⁵, differential gene expression analysis was performed using the interactive web tool GEO2R (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/info/geo2r.html>) to plot the log fold-change and the FDR-corrected p-value. For the RNA-sequencing dataset⁵⁶, the complete gene list available on NCBI was used to plot the log fold-change and the FDR-corrected p-value.

Intracardial perfusion

At the time of sacrifice, adult mice and mice at postnatal stages P4 to P14 were anaesthetized as described above, then intracardially perfused with ice-cold PBS for 3 min and with ice-cold 4% formaldehyde in PBS for 3 min. Brains were dissected out and samples were post-fixed overnight at 4 °C in 4% formaldehyde.

Immunofluorescence on brain sections

Samples were post-fixed in 4% formaldehyde (Sigma) overnight and transferred to 30% sucrose for 2 days at 4 °C to cryoprotect. Samples were then embedded in tissue freezing medium compound (MM-France) and frozen at -80 °C. 30 µm and 20 µm thick coronal sections were performed for 10-week brain and young animals, respectively using a cryostat (CryoStar NX50, Thermo Fisher Scientific). 14 µm thick transversal sections were performed for optic chiasm. Immunohistochemistry on tissue sections was performed according to standard procedures. Sections were blocked for 1 h in PBS 0.1% Triton, 3% BSA, 5% Donkey Serum and incubated with the primary antibodies diluted in the blocking solution overnight at 4 °C. The following primary antibodies were used: anti-NCAM1 (1:100, Rabbit, Cell signalling Technology, #99746), anti-DCLK2 (1:100, Rabbit, Abcam, ab106639), anti-Sema4D (1:100, Rabbit, Abcam, ab134128), anti-CSPG4 (1:100, Rabbit, Proteintech, 55027-1-AP), anti-Ephrin-B3 (1:100, Mouse, R&D Systems, MAB395), anti-GFAP (1:200, Rat, Thermo Fisher Scientific, 13-0300), anti-Sema7A (1:100, Rabbit, Abcam, ab23578), anti-NrCAM (1:100, Rabbit, Abcam, ab24344), anti-Olig2 (1:100, Goat, R&D Systems, AF2418), anti-Ibal (1:100, Goat, Novus Biologicals, NB100-1028), anti-NeuN (1:100, Mouse, Sigma-Aldrich, MAB377), anti-NeuN (1:100, Rabbit, Abcam, ab177487). Triton was omitted from the blocking solution for NCAM1, Sema4D, Sema7A and Ephrin-B3 immunostaining. For CSPG4, and Sema4D, heat-induced antigen retrieval was performed for 5 min in citrate buffer. After several washes by incubation with Alexa-fluor conjugated (anti-Rabbit, Thermo Fisher Scientific; anti-Mouse, Thermo Fisher Scientific; anti-Rat, Jackson Laboratory; anti-Goat, Thermo Fisher Scientific) antibodies according to standard protocol (dilution 1:200). Slides were mounted with Fluoromount-G with DAPI medium (Thermo Fisher Scientific).

In utero eye injection

In utero eye injection was performed at E15.5 of timed pregnant WT female mice. Each pregnant female was anaesthetized and maintained under isoflurane using a facial mask during the whole time of surgery. The pregnant female was kept on a 37 °C plate during the whole time of surgery. After shaving and disinfecting the abdomen with 70% ethanol and betadine, laparotomy was performed using fine scissors in order to expose the uterus. The embryos were held in place through the uterus and frequently humidified with warm sterile PBS. In utero embryo eye injection of CTB-555 was done using a capillary connected to a pico-injector (Eppendorf). After injection of all embryos of the litter, the uterine horns were placed back into the abdominal cavity

and the abdominal wall and skins were stitched. Immediately after the surgery, the pregnant female was injected with 1X Buprecare (200 µl: 10 µl/g of animal weight; diluted in sterile PBS) and monitored regularly during recovery.

Embryonic and postnatal sample collection

One day after in utero eye injection (at E16.5 of the timed pregnancy), each pregnant female was euthanized by cervical dislocation and the embryos were quickly removed from the uterine horns. Eye injection of CTB-555 was verified under a fluorescent binocular. For embryonic and postnatal P2 stages, the head of positive embryos was fixed in 4% formaldehyde overnight at 4 °C, then incubated in PBS 30% sucrose for cryopreservation. Heads and brains (from P4 and older) were embedded in tissue freezing medium and frozen at -80 °C until cryostat sectioning.

For Western Blot analysis, embryo heads were flash frozen on dry ice and thick slices were performed. Under a fluorescent binocular, the region of interest was microdissected. Samples were then frozen at -80 °C until protein extraction.

In situ hybridization on retina sections

Templates of antisense in situ hybridization probes for EphB2 and EphA4 were cloned in a pGEMT easy vector (Promega) and synthesized using digoxigenin (DIG) RNA labelling Kit (Roche) after linearization of the plasmid. The following primers were used for template amplification by PCR from cDNA of mouse embryonic or adult brain: EphB2-forward: TCATAAGGGAAGTGACGGTCT, EphB2-reverse: CCCTGG TGTATTGCCTAAGTC; EphA4-forward: GGTATAAGGACAACCTCAGC GC, EphA4-reverse: CTTCTGTGGTATAAACCGAGCC, Plexin-B1-forward: CCTCCGAGAGGCTCCAGATGCT, Plexin-B1-reverse: GCAGTGC CATCCTCCTCCAGG; Plexin-C1-forward: GGGACTTCAAGCGACTG AG, Plexin-C1-reverse: AGTGTCTTGGCGAGATGCTT. In situ hybridization was performed as previously described¹³. Briefly, after hybridization of the DIG-labelled probe on slides, the alkaline phosphatase-conjugated anti-digoxigenin antibody (Roche) was incubated overnight at room temperature. Alkaline phosphatase staining was probed with NBT-BCIP (Roche) and slides were washed and post-fixed after the desired coloration intensity was obtained.

Stripe assay

Stripe set up. Glass coverslips (diameter 1.2 mm) were coated with poly-L-lysine (0.5 mg/ml in ultrapure water, Sigma-Aldrich) and left overnight at room temperature. After two washes with ultrapure water, coverslips were dried.

Silicon matrices (Bastmeyer laboratory, Karlsruher Institut für Technologie, matrix code 2B, channel width: 50 µm parallel) were boiled in ultrapure water, dried and then UV-treated. They were placed on the coverslips and first, recombinant mouse Ephrin-B3-FC chimera protein (10 µg/ml, R&D Systems, 7655-EB), recombinant mouse Sema4D-FC chimera protein (10 µg/ml, R&D Systems, 5235-S4B), recombinant mouse Sema7A-FC chimera protein (10 µg/ml, R&D Systems, 1835-S3), and Human IgG FC fragment (10 µg/ml, Millipore, 401104) as a control, were diluted in HBSS (Gibco, Fisher Scientific, 12082739) containing Alexa-Fluor 488 (1:500, Rabbit, Thermo Fisher Scientific) and injected in the chamber. After 30 min of incubation at 37 °C, matrices were removed and two washes with PBS were performed. Human IgG FC fragment (10 µg/ml) was added (without fluorescent antibody) and incubated for 30 min at 37 °C. FC was then removed and two PBS washes were done before adding laminin (20 µg/ml) on coverslips for at least 2 h at room temperature. After two washes with ultrapure water, coverslips were covered with Neurobasal-A.

Explant culture. PTEN^{fl/fl}/SOCS^{fl/fl} adult retina explants previously injected with AAV2-Cre and AAV2-CNTF were prepared according to

ref. 66. Briefly, mice were sacrificed by cervical dislocation following the institution's guidelines. Eyeballs were removed using Dumont's forceps #5 and dissected in ice-cold Hibernate A (BrainBits, HACA). Retina were dissected out and cut into small pieces (about 500 μm in diameter) with a scalpel. A retina explant was laid onto the coated coverslip before adding Neurobasal-A medium containing B-27 (Thermo Fisher Scientific), L-glutamine (Corning) and Penicillin-Streptomycin (Thermo Fisher Scientific).

Immunofluorescence on explant culture. After 7 days, explants were fixed and stained for β Tubulin III (TUJ1) (1:400, mouse, BioLegend, 801202) as described above, except that PBS was supplemented with 0.1% Triton for washing, primary antibody and secondary antibody steps.

Data analysis. Explants were imaged using an epifluorescence microscope. The number of axons in fluorescent and dark stripes were manually counted at the exit point of the explant. Each explant was considered as biologically independent. Regions of interest were designed on the sides of the explant orthogonal to the stripe direction. Regions of interest were discarded if the stripes did not have a sharp, clear pattern. The number of exiting neurites was normalized to the number of stripes for each region of interest. For each condition (Fc/Fc, Ephrin-B3-Fc/Fc, Sema4D-Fc/Fc, Sema7A-Fc/Fc), the number of neurites in fluorescent stripes and dark stripes were compared using two-tailed paired *t*-test, using GraphPad Prism version 9.1.2.

Immunofluorescence on growth cones

Adult retina explants from PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl} mice injected with AAV2-Cre were obtained according to ref. 66. Briefly, glass coverslips were coated overnight with poly-L-lysine (0.5 mg/ml in ultrapure water, Sigma-Aldrich) then for 2 h with laminin (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma-Aldrich). Adult retina explants were cultured on methylcellulose-containing coating medium. After 7 days of culture, explants were carefully fixed during 15 min at room temperature in PBS 4% formaldehyde 1.5% sucrose. After 3 washes of 10 min in 1X PBS, explants were incubated in primary antibody against EphB2 (1:200, Rabbit, Abcam, ab216629), EphA4 (1:200, Rabbit, Thermo Fisher Scientific, 21875-1-AP), Plexin-B1 (1:200, Mouse, R&D Systems, MAB3749), Plexin-C1 (1:200, Mouse, R&D Systems, AF5375) and β -tubulin III (TUJ1, 1:500, Mouse, Biolegend, 801202 or Rabbit, Abcam, ab18207) overnight at 4 °C. After several washes in PBS, explants were incubated secondary antibodies for 2 h at room temperature (Alexa fluor 488-conjugated anti-Rabbit 1:400 (or 1:800 for Rabbit anti-Tuj1), Thermo Fisher Scientific; Alexa fluor 568-conjugated anti-Mouse, 1:400 (or 1:800 for Mouse anti-Tuj1), Thermo Fisher Scientific; Alexa fluor 647-conjugated Phalloidin, 1:400, Thermo Fisher Scientific). Coverslips were mounted with Fluoromount-G medium containing DAPI. Growth cones were imaged with Airyscan imaging and processing on a LSM710 confocal imaging unit (Zeiss) with the Zen software (version 2.1 SP3).

Whole-mount tissue clarification and imaging

Brain transpazirization. Whole-brain transpazirization was performed according to ref. 98. For visualization of the brain targets and optic tracts of the visual system, each eye of an adult WT mouse was injected with CTB-555 and CTB-647. After intracardial perfusion, brain and optic chiasm were dissected out and post-fixed in 4% formaldehyde. Brains were dehydrated in methanol, then bleached overnight in 6% H₂O₂ in methanol. After rehydration in PBS, brains were permeabilized in PBS 0.5% Triton for several days at 4 °C. The brain was dehydrated in methanol, then incubated for several hours in dichloromethane/methanol (2:1), then 30 min in dichloromethane (Sigma-Aldrich) before transpazirization in dibenzyl ether (Sigma-Aldrich). Transpazirized brain was imaged using the lightsheet microscope from LaVision

Biotec. Data processing and visualization were performed using Imaris software (x64 version 9.9.1).

Optic nerve and chiasm clarification. Optic nerve and chiasm clarification was performed according to ref. 66. After intracardial perfusion and post-fixation of the eyes, optic nerves attached to the optic chiasm were dissected and dehydrated in ethanol. Optic nerves were incubated for 2 h in hexane, then transpazirized in benzyl benzoate/benzyl alcohol (2:1) (Sigma-Aldrich). Optic nerves and chiasm were imaged using a spinning disk confocal microscope (Andor Dragonfly) with a custom stitching module (Metamorph version 7.10.2.240).

Imaging

Epifluorescence microscope Nikon Ti2 Eclipse was used for imaging of brain sections and co-cultures, with NIS-Elements software (version 5.11.02). Cleared brain was imaged using lightsheet microscope from LaVision Biotec. Cleared optic nerves, optic chiasm, and brain slices labelled with cell markers were imaged using a spinning disk confocal microscope (Andor Dragonfly spinning disk confocal microscope, Oxford Instruments). Images were analysed using Fiji software (version 2.0.0).

Regeneration and axon guidance quantification

For axon regeneration in wild-type condition, individual CTB-positive axons were manually counted at defined distances from the lesion site. For axon regeneration in the long-distance regeneration model, individual CTB-positive axons were manually counted in the ipsilateral side along a line at 100 μm before the optic chiasm. For axon guidance in the long-distance regeneration model, CTB-positive axons were manually counted along a line at 200 μm into the optic chiasm, and along the midline. Bar graph data are represented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Individual values are plotted on each graph. For each shRNA against guidance receptors (sh EphA4+sh EphB2 and sh Plexin-B1), the same dataset of sh scrambled was used to compare the number of axons. The number of axons were compared using two-tailed unpaired Student's *t*-test, using GraphPad Prism version 9.1.2.

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The LC-MS/MS data have been submitted to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE⁹⁹ partner repository under dataset identifier PDX029325. For peptide and protein identification with Mascot, concomitant searches were done against Uniprot database [<https://www.uniprot.org/>] (Mus Musculus taxonomy, for Optic chiasm and SCN samples, downloaded in June 2019 with 87573 entries, and for dLGN, vLGN and SCol samples, downloaded in August 2020 with 87975 entries). The protein expression data generated in this study are available in Supplementary Data 1–4. The Western blot data generated in this study are provided in the Source Data file. Quantification and statistics of source data are provided in the Source Data file. Source data are provided with this paper. RGC gene expression data used in this study are available on NCBI's GEO database under the accession codes: GSE115404 (atlas of neonatal (P5) RGC from single-cell transcriptomics analysis, user-friendly version at <https://health.uconn.edu/neuroregeneration-lab/rgc-subtypes-gene-browser/>); GSE137400 (atlas of adult RGC from single-cell transcriptomics analysis, user-friendly version at https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell/study/SCP509/mouse-retinal-ganglion-cell-adult-atlas-and-optic-nerve-crush-time-series/); GSE32309 (microarray dataset comparing PTEN^{-/-} SOCS3^{-/-} RGC to WT RGC after optic nerve crush); GSE87046 (RNA-sequencing dataset comparing Sox11-overexpressing RGC to

control RGC after optic nerve crush). Source data are provided with this paper.

References

- He, Z. & Jin, Y. Intrinsic Control of Axon Regeneration. *Neuron* **90**, 437–451 (2016).
- Park, K. K. et al. Promoting Axon Regeneration in the Adult CNS by Modulation of the PTEN/mTOR Pathway. *Science* **322**, 963–966 (2008).
- Belin, S. et al. Injury-induced decline of intrinsic regenerative ability revealed by quantitative proteomics. *Neuron* **86**, 1000–1014 (2015).
- Lim, J.-H. A. et al. Neural activity promotes long distance, target-specific regeneration of adult retinal axons. *Nat. Neurosci.* **19**, 1073–1084 (2016).
- Lu, Y. et al. Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision. *Nature* **588**, 124–129 (2020).
- Pernet, V. & Schwab, M. E. Lost in the jungle: new hurdles for optic nerve axon regeneration. *Trends Neurosci.* **37**, 381–387 (2014).
- Crair, M. C. & Mason, C. A. Reconnecting Eye to Brain. *J. Neurosci.* **36**, 10707–10722 (2016).
- Pernet, V. et al. Long-distance axonal regeneration induced by CNTF gene transfer is impaired by axonal misguidance in the injured adult optic nerve. *Neurobiol. Dis.* **51**, 202–213 (2013).
- Pernet, V. et al. Misguidance and modulation of axonal regeneration by Stat3 and Rho/ROCK signaling in the transparent optic nerve. *Cell Death Dis.* **4**, e734–e734 (2013).
- Luo, X. et al. Three-dimensional evaluation of retinal ganglion cell axon regeneration and pathfinding in whole mouse tissue after injury. *Exp. Neurol.* **247**, 653–662 (2013).
- Bellon, A. & Mann, F. Keeping up with advances in axon guidance. *Curr. Opin. Neurobiol.* **53**, 183–191 (2018).
- Stoeckli, E. T. Understanding axon guidance: are we nearly there yet? *Development* **145**, dev151415 (2018).
- Charoy, C. et al. gdnf activates midline repulsion by Semaphorin3B via NCAM during commissural axon guidance. *Neuron* **75**, 1051–1066 (2012).
- Delloye-Bourgeois, C. et al. PlexinA1 is a new Slit receptor and mediates axon guidance function of Slit C-terminal fragments. *Nat. Neurosci.* **18**, 36–45 (2015).
- Kuwajima, T. et al. Optic chiasm presentation of Semaphorin6D in the context of Plexin-A1 and Nr-CAM promotes retinal axon midline crossing. *Neuron* **74**, 676–690 (2012).
- Nédelec, S. et al. Concentration-Dependent Requirement for Local Protein Synthesis in Motor Neuron Subtype-Specific Response to Axon Guidance Cues. *J. Neurosci.* **32**, 1496–1506 (2012).
- Koser, D. E. et al. Mechanosensing is critical for axon growth in the developing brain. *Nat. Neurosci.* **19**, 1592–1598 (2016).
- Nicol, X. et al. cAMP oscillations and retinal activity are permissive for ephrin signaling during the establishment of the retinotopic map. *Nat. Neurosci.* **10**, 340–347 (2007).
- Plazas, P. V., Nicol, X. & Spitzer, N. C. Activity-dependent competition regulates motor neuron axon pathfinding via PlexinA3. *PNAS* **110**, 1524–1529 (2013).
- Bourikas, D. et al. Sonic hedgehog guides commissural axons along the longitudinal axis of the spinal cord. *Nat. Neurosci.* **8**, 297–304 (2005).
- Zou, Y. & Lyuksyutova, A. I. Morphogens as conserved axon guidance cues. *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**, 22–28 (2007).
- Yam, P. T. & Charron, F. Signaling mechanisms of non-conventional axon guidance cues: the Shh, BMP and Wnt morphogens. *Curr. Opin. Neurobiol.* **23**, 965–973 (2013).
- Pollerberg, G. E., Thelen, K., Theiss, M. O. & Hochlehnert, B. C. The role of cell adhesion molecules for navigating axons: Density matters. *Mechanisms Dev.* **130**, 359–372 (2013).
- Prieur, D. S. & Rebsam, A. Retinal axon guidance at the midline: Chiasmatic misrouting and consequences. *Dev. Neurobiol.* **77**, 844–860 (2017).
- Bradbury, E. J. & Burnside, E. R. Moving beyond the glial scar for spinal cord repair. *Nat. Commun.* **10**, 3879 (2019).
- Silver, J. & Miller, J. H. Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 146–156 (2004).
- Seabrook, T. A., Burbridge, T. J., Crair, M. C. & Huberman, A. D. Architecture, Function, and Assembly of the Mouse Visual System. *Annu. Rev. Neurosci.* **40**, 499–538 (2017).
- Kalish, B. T. et al. Single-cell transcriptomics of the developing lateral geniculate nucleus reveals insights into circuit assembly and refinement. *PNAS* **115**, E1051–E1060 (2018).
- Wang, Q., Marcucci, F., Cerullo, I. & Mason, C. Ipsilateral and Contralateral Retinal Ganglion Cells Express Distinct Genes during Decussation at the Optic Chiasm. *eNeuro* **3**, ENEURO.0169-16.2016 (2016).
- Wen, S. et al. Spatiotemporal single-cell analysis of gene expression in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Nature Neurosci.* 1–12 <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0586-x> (2020).
- Sabbagh, U. et al. Distribution and development of molecularly distinct perineuronal nets in visual thalamus. *J. Neurochem.* **147**, 626–646 (2018).
- Su, J. et al. Reelin Is Required for Class-Specific Retinogeniculate Targeting. *J. Neurosci.* **31**, 575–586 (2011).
- Schwanhäusser, B. et al. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337–342 (2011).
- Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44–57 (2009).
- Bouzioukh, F. et al. Semaphorin3A regulates synaptic function of differentiated hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* **23**, 2247–2254 (2006).
- Bouzioukh, F. et al. Tyrosine Phosphorylation Sites in ephrinB2 Are Required for Hippocampal Long-Term Potentiation But Not Long-Term Depression. *J. Neurosci.* **27**, 11279–11288 (2007).
- Glasgow, S. D., Ruthazer, E. S. & Kennedy, T. E. Guiding synaptic plasticity: Novel roles for netrin-1 in synaptic plasticity and memory formation in the adult brain. *The J. Physiol.* **599**, 493–505.
- Sheng, L., Leshchyn'ska, I. & Sytnyk, V. Neural Cell Adhesion Molecule 2 Promotes the Formation of Filopodia and Neurite Branching by Inducing Submembrane Increases in Ca²⁺ Levels. *J. Neurosci.* **35**, 1739–1752 (2015).
- Walsh, F. S. & Doherty, P. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 425–456 (1997).
- Frei, J. A., Andermatt, I., Gesemann, M. & Stoeckli, E. T. The SynCAM synaptic cell adhesion molecules are involved in sensory axon pathfinding by regulating axon-axon contacts. *J. Cell Sci.* **127**, 5288–5302 (2014).
- Imondi, R., Wideman, C. & Kaprielian, Z. Complementary expression of transmembrane ephrins and their receptors in the mouse spinal cord: a possible role in constraining the orientation of longitudinally projecting axons. *Development* **127**, 1397–1410 (2000).
- Lee, S. et al. Atypical Protein Kinase C and Par3 Are Required for Proteoglycan-Induced Axon Growth Inhibition. *J. Neurosci.* **33**, 2541–2554 (2013).
- Filous, A. R. et al. Entrapment via synaptic-like connections between NG2 proteoglycan+ cells and dystrophic axons in the lesion plays a role in regeneration failure after spinal cord injury. *J. Neurosci.* **34**, 16369–16384 (2014).
- Nawabi, H. et al. Doublecortin-Like Kinases Promote Neuronal Survival and Induce Growth Cone Reformation via Distinct Mechanisms. *Neuron* **88**, 704–719 (2015).

45. Husmann, K., Carbonetto, S. & Schachner, M. Distinct Sites on Tenascin-C Mediate Repellent or Adhesive Interactions with Different Neuronal Cell Types. *Cell Adhes. Commun.* **3**, 293–310 (1995).
46. Cheah, M. et al. Expression of an Activated Integrin Promotes Long-Distance Sensory Axon Regeneration in the Spinal Cord. *J. Neurosci.* **36**, 7283–7297 (2016).
47. Chen, J. et al. The Extracellular Matrix Glycoprotein Tenascin-C Is Beneficial for Spinal Cord Regeneration. *Mol. Ther.* **18**, 1769–1777 (2010).
48. Sofroniew, M. V. & Vinters, H. V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* **119**, 7–35 (2010).
49. Sefton, A. J. The innervation of the Lateral Geniculate Nucleus and Anterior Colliculus in the rat. *Vis. Res.* **8**, 867–881 (1968).
50. Guido, W. Development, form, and function of the mouse visual thalamus. *J. Neurophysiol.* **120**, 211–225 (2018).
51. Pasterkamp, R. J., Kolk, S. M., Hellemons, A. J. & Kolodkin, A. L. Expression patterns of semaphorin7A and plexinC1 during rat neural development suggest roles in axon guidance and neuronal migration. *BMC Dev. Biol.* **7**, 98 (2007).
52. Parkash, J. et al. Semaphorin7A regulates neuroglial plasticity in the adult hypothalamic median eminence. *Nat. Commun.* **6**, 6385 (2015).
53. Rheaume, B. A. et al. Single cell transcriptome profiling of retinal ganglion cells identifies cellular subtypes. *Nat Commun.* **9**, 2759 (2018).
54. Tran, N. M. et al. Single-Cell Profiles of Retinal Ganglion Cells Differing in Resilience to Injury Reveal Neuroprotective Genes. *Neuron* **104**, 1039–1055.e12 (2019).
55. Sun, F. et al. Sustained axon regeneration induced by co-deletion of PTEN and SOCS3. *Nature* **480**, 372–375 (2011).
56. Norsworthy, M. W. et al. Sox11 Expression Promotes Regeneration of Some Retinal Ganglion Cell Types but Kills Others. *Neuron* **94**, 1112–1120.e4 (2017).
57. Duan, X. et al. Subtype-Specific Regeneration of Retinal Ganglion Cells following Axotomy: Effects of Osteopontin and mTOR Signaling. *Neuron* **85**, 1244–1256 (2015).
58. Petros, T. J., Rebsam, A. & Mason, C. A. Retinal Axon Growth at the Optic Chiasm: To Cross or Not to Cross. *Annu. Rev. Neurosci.* **31**, 295–315 (2008).
59. Kullander, K. et al. Ephrin-B3 is the midline barrier that prevents corticospinal tract axons from recrossing, allowing for unilateral motor control. *Genes Dev.* **15**, 877–888 (2001).
60. Benson, M. D. et al. Ephrin-B3 is a myelin-based inhibitor of neurite outgrowth. *Proc. Natl Acad. Sci.* **102**, 10694–10699 (2005).
61. McClelland, A. C., Hruska, M., Coenen, A. J., Henkemeyer, M. & Dalva, M. B. Trans-synaptic EphB2-ephrin-B3 interaction regulates excitatory synapse density by inhibition of postsynaptic MAPK signaling. *Proc. Natl Acad. Sci.* **107**, 8830–8835 (2010).
62. Noraz, N. et al. Syk kinases are required for spinal commissural axon repulsion at the midline via the ephrin/Eph pathway. *Development* **143**, 2183–2193 (2016).
63. Ito, Y., Oinuma, I., Katoh, H., Kaibuchi, K. & Negishi, M. Semaphorin 4D/plexin-B1 activates GSK-3 β through R-Ras GAP activity, inducing growth cone collapse. *EMBO Rep.* **7**, 704–709 (2006).
64. Tasaka, G., Negishi, M. & Oinuma, I. Semaphorin 4D/Plexin-B1-Mediated M-Ras GAP Activity Regulates Actin-Based Dendrite Remodeling through Lamellipodin. *J. Neurosci.* **32**, 8293–8305 (2012).
65. Moreau-Fauvarque, C. et al. The Transmembrane Semaphorin Sema4D/CD100, an Inhibitor of Axonal Growth, Is Expressed on Oligodendrocytes and Upregulated after CNS Lesion. *J. Neurosci.* **23**, 9229–9239 (2003).
66. Schaeffer, J., Delpech, C., Albert, F., Belin, S. & Nawabi, H. Adult Mouse Retina Explants: From ex vivo to in vivo Model of Central Nervous System Injuries. *Front. Mol. Neurosci.* **13**, 599948 (2020).
67. Walter, J., Henke-Fahle, S. & Bonhoeffer, F. Avoidance of posterior tectal membranes by temporal retinal axons. *Development* **101**, 909–913 (1987).
68. Scott, G. A., McClelland, L. A., Fricke, A. F. & Fender, A. Plexin C1, a receptor for semaphorin 7a, inactivates cofilin and is a potential tumor suppressor for melanoma progression. *J. Invest Dermatol.* **129**, 954–963 (2009).
69. Duffy, P. et al. Myelin-derived ephrinB3 restricts axonal regeneration and recovery after adult CNS injury. *Proc. Natl Acad. Sci.* **109**, 5063–5068 (2012).
70. Joly, S., Jordi, N., Schwab, M. E. & Pernet, V. The Ephrin receptor EphA4 restricts axonal sprouting and enhances branching in the injured mouse optic nerve. *Eur. J. Neurosci.* **40**, 3021–3031 (2014).
71. de Lima, S. et al. Full-length axon regeneration in the adult mouse optic nerve and partial recovery of simple visual behaviors. *Proc. Natl Acad. Sci.* **109**, 9149–9154 (2012).
72. Zang, Y., Chaudhari, K. & Bashaw, G. J. New insights into the molecular mechanisms of axon guidance receptor regulation and signaling. *Curr. Top. Dev. Biol.* **142**, 147–196 (2021).
73. Alvarez, S., Varadarajan, S. G. & Butler, S. J. Dorsal commissural axon guidance in the developing spinal cord. *Curr. Top. Dev. Biol.* **142**, 197–231 (2021).
74. Mason, C. & Slavi, N. Retinal Ganglion Cell Axon Wiring Establishing the Binocular Circuit. *Annu Rev. Vis. Sci.* **6**, 215–236 (2020).
75. Zhang, H.-L., Wang, J. & Tang, L. Sema4D knockdown in oligodendrocytes promotes functional recovery after spinal cord injury. *Cell Biochem Biophys.* **68**, 489–496 (2014).
76. Kamiguchi, H. The role of cell adhesion molecules in axon growth and guidance. *Adv. Exp. Med Biol.* **621**, 95–103 (2007).
77. Castellani, V., Chédotal, A., Schachner, M., Faivre-Sarrailh, C. & Rougon, G. Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* **27**, 237–249 (2000).
78. Nawabi, H. et al. A midline switch of receptor processing regulates commissural axon guidance in vertebrates. *Genes Dev.* **24**, 396–410 (2010).
79. Rigby, M. J., Gomez, T. M. & Puglielli, L. Glial Cell-Axonal Growth Cone Interactions in Neurodevelopment and Regeneration. *Front Neurosci.* **14**, 203 (2020).
80. Neugebauer, K. M., Tomaselli, K. J., Lilien, J. & Reichardt, L. F. N-cadherin, NCAM, and integrins promote retinal neurite outgrowth on astrocytes in vitro. *J. Cell Biol.* **107**, 1177–1187 (1988).
81. Ueno, M. et al. Olig2-Induced Semaphorin Expression Drives Corticospinal Axon Retraction After Spinal Cord Injury. *Cereb. Cortex.* **30**, 5702–5716 (2020).
82. Mei, Q. et al. Hierarchically Clustering to 1,033 Genes Differentially Expressed in Mouse Superior Colliculus in the Courses of Optic Nerve Development and Injury. *Cell Biochem Biophys.* **67**, 753–761 (2013).
83. Kaiser, J. et al. The Spinal Transcriptome after Cortical Stroke: In Search of Molecular Factors Regulating Spontaneous Recovery in the Spinal Cord. *J. Neurosci.* **39**, 4714–4726 (2019).
84. Llobet Rosell, A. & Neukomm, L. J. Axon death signalling in Wallerian degeneration among species and in disease. *Open Biol.* **9**, (2019).
85. Burda, J. E. & Sofroniew, M. V. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* **81**, 229–248 (2014).
86. Tran, T. S. et al. Neuropilin2 regulates the guidance of post-crossing spinal commissural axons in a subtype-specific manner. *Neural Dev.* **8**, 15 (2013).
87. Kadison, S. R., Mäkinen, T., Klein, R., Henkemeyer, M. & Kaprielian, Z. EphB receptors and ephrin-B3 regulate axon guidance at the ventral

- midline of the embryonic mouse spinal cord. *J. Neurosci.* **26**, 8909–8914 (2006).
88. Grunwald, I. C. et al. Hippocampal plasticity requires postsynaptic ephrinBs. *Nat. Neurosci.* **7**, 33–40 (2004).
89. Paixão, S. et al. EphrinB3/EphA4-mediated guidance of ascending and descending spinal tracts. *Neuron* **80**, 1407–1420 (2013).
90. Goldshmit, Y., Galea, M. P., Wise, G., Bartlett, P. F. & Turnley, A. M. Axonal regeneration and lack of astrocytic gliosis in EphA4-deficient mice. *J. Neurosci.* **24**, 10064–10073 (2004).
91. McDermott, J. E., Goldblatt, D. & Paradis, S. Class 4 Semaphorins and Plexin-B receptors regulate GABAergic and glutamatergic synapse development in the mammalian hippocampus. *Mol. Cell. Neurosci.* **92**, 50–66 (2018).
92. Zhang, R.-X. et al. EphB2 in the Medial Prefrontal Cortex Regulates Vulnerability to Stress. *Neuropsychopharmacol* **41**, 2541–2556 (2016).
93. Goparaju, C. et al. Overexpression of EPH receptor B2 in malignant mesothelioma correlates with oncogenic behavior. *J. Thorac. Oncol.* **8**, 1203–1211 (2013).
94. Khodosevich, K., Watanabe, Y. & Monyer, H. EphA4 preserves postnatal and adult neural stem cells in an undifferentiated state in vivo. *J. Cell Sci.* **124**, 1268–1279 (2011).
95. Salvetti, A. et al. Nuclear Functions of Nucleolin through Global Proteomics and Interactomic Approaches. *J. Proteome Res.* **15**, 1659–1669 (2016).
96. Bouyssie, D. et al. Proline: an efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics. *Bioinformatics* **36**, 3148–3155 (2020).
97. Wiczorek, S. et al. DAPAR & ProStaR: software to perform statistical analyses in quantitative discovery proteomics. *Bioinformatics* **33**, 135–136 (2017).
98. Renier, N. et al. Mapping of brain activity by automated volume analysis of immediate early genes. *Cell* **165**, 1789–1802 (2016).
99. Perez-Riverol, Y. et al. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucl. Acids Res.* **47**, D442–D450 (2019).

Acknowledgements

We thank Dr Kim Ba-Charvet and Dr Charlotte Decourt for precious advice, and Dr Julien Courchet (INMG, Lyon, France) and Dr Xavier Nicol (Institut de la Vision, Paris, France) for their comments and feedbacks during Noemie Vilallongue thesis committee meetings. We thank the Grenoble Institute of Neuroscience animal facility. This work was supported by the Photonic Imaging Center of Grenoble Institute Neuroscience (Univ Grenoble Alpes – Inserm U1216) which is part of the ISdV core facility and certified by the IBiSA label. The proteomic experiments were partially supported by Agence Nationale de la Recherche under projects ProFI (Proteomics French Infrastructure, ANR-10-INBS-08) and GRAL, a program from the Chemistry Biology Health (CBH) Graduate School of University Grenoble Alpes (ANR-17-EURE-0003). This work was supported by a grant from ANR to HN (C7H-ANR16C49) and SB (ANR-18-CE16-0007). HN is supported by

NRJ Foundation and the European Research Council (ERC-St17-759089). JS is supported by Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) postdoctoral fellowship (SPF201909009106). CD is supported by a grant from the French National Research Agency in the framework of the “investissements d’Avenir” program (ANR-15-IDEX-02 NeuroCoG) and by Fondation de France, Berthe Fouassier grant.

Author contributions

H.N. and S.B. conceptualized the study. N.V., J.S., C.D., B.B., A.P., E.P., and B.E. performed experiments. Y.C. and A.M.H. performed mass spectrometry-based proteomic data collection and analysis. N.V. and J.S. analyzed and interpreted data. N.V. and J.S. drafted figures. N.V., J.S., S.B., and H.N. wrote the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33799-4>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Homaira Nawabi.

Peer review information *Nature Communications* thanks Ephraim Trakhtenberg, Marius Ueffing, and the other, anonymous, reviewer for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

Supplementary Figures for
Guidance landscapes unveiled by quantitative proteomics to
control reinnervation in adult visual system

Noemie Vilallongue^{1†}, Julia Schaeffer^{1†}, Anne-Marie Hesse², Céline Delpech¹,
Béatrice Blot¹, Antoine Paccard¹, Elise Plissonnier¹, Blandine Excoffier¹,
Yohann Couté², Stephane Belin^{1‡}, Homaira Nawabi^{1*‡}

† These authors contributed equally.

‡ These authors jointly supervised this work.

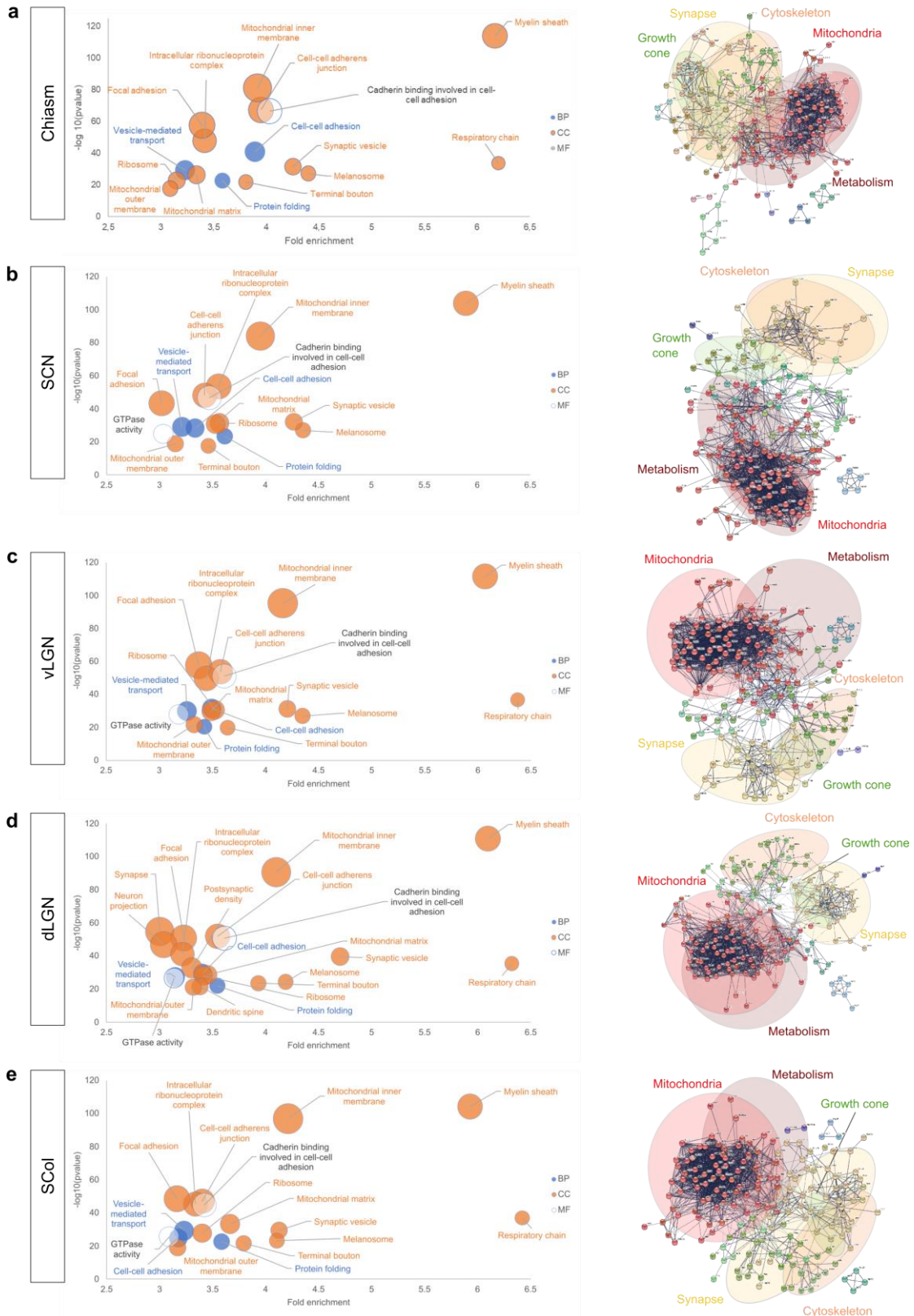
*Email: homaira.nawabi@inserm.fr

This PDF file includes:

Supplementary Figures 1 to 7

Supplementary References

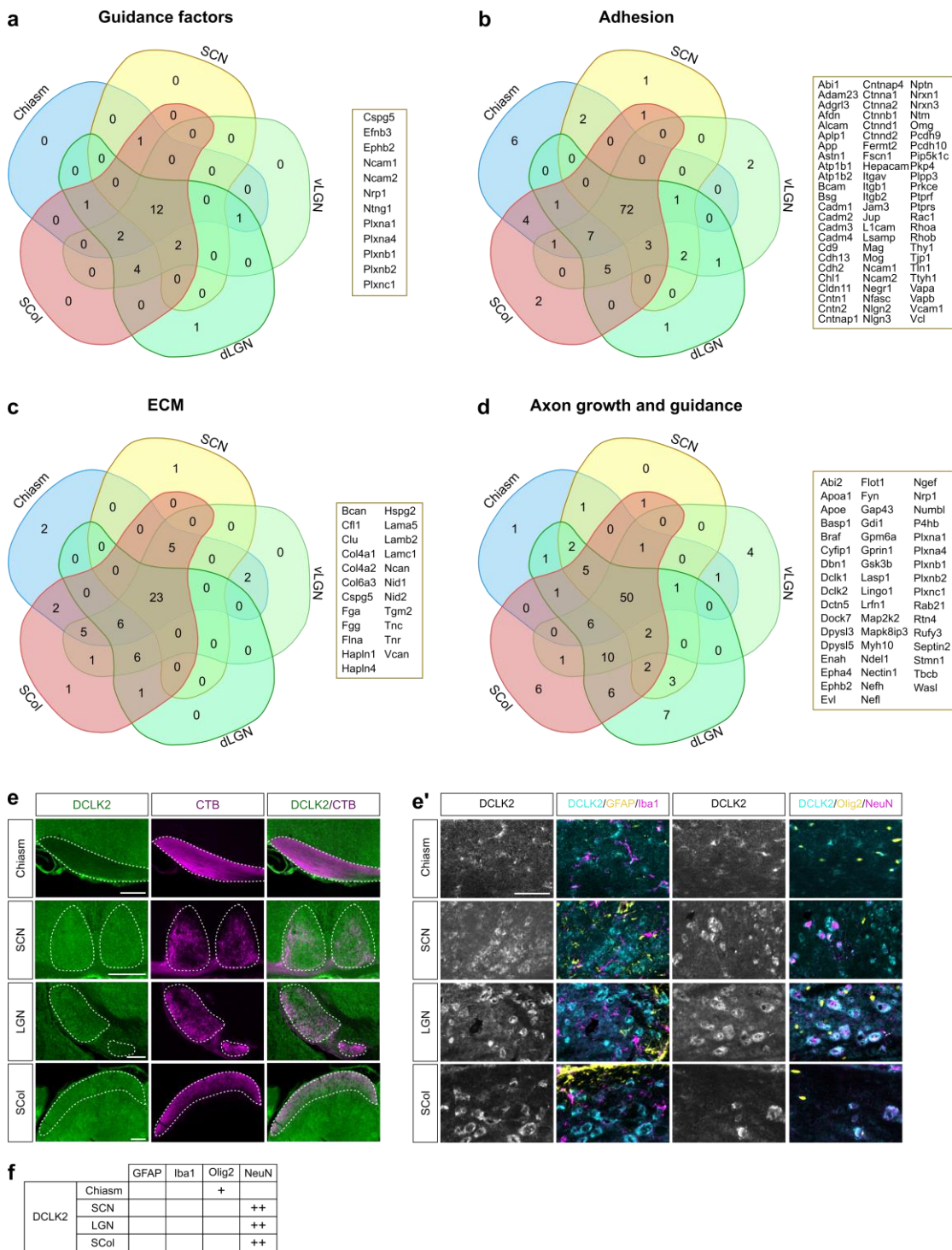
Supplementary Figure 1



Supplementary Fig. 1 Adult visual targets exhibit enrichment of proteins related to connectivity and synaptic activity. a-e Bubble plots displaying enriched Gene Ontology (GO) terms in **a** optic chiasm, **b** SCN, **c** vLGN, **d** dLGN and **e** SCoI, as analyzed with DAVID (left). Enriched GO terms are related to myelin sheath (GO:0043209), mitochondrial

constituents (eg, GO:0005759 mitochondrial matrix, GO:0005743 mitochondrial inner membrane, GO:0070469 respiratory chain) and synapses (eg, GO:0008021 synaptic vesicle, GO:0014069 postsynaptic density), all terms characteristic of neuronal activity. Also, some of the most enriched GO terms shared by all regions of interest are linked to cell adhesion (eg, GO:0005913 cell-cell adherens junction, GO:0005925 focal adhesion, GO:0098641 cadherin binding involved in cell-cell adhesion, GO:0098609 cell-cell adhesion), reflective of a high connectivity within the tissue. Terms associated with biological processes (BP) are represented in blue, cellular compartments (CC) in orange and molecular functions (MF) in grey. Only GO terms with a protein count higher than 50, a fold enrichment higher than 3 and a corrected p-value < 0.01 are represented. The p-value is the modified Fisher Exact p-value (EASE score). The bubble size of each GO term is representative of the number of proteins detected in the corresponding brain region. Networkbased cluster analysis of the 200 most abundant proteins identified in each visual target (right): **a** optic chiasm, **b** SCN, **c** vLGN, **d** dLGN, **e** SCoI as analyzed with STRING. Only interactions with high confidence (minimum required interaction score > 0.700) are represented. Clustering is done with a Markov Cluster Algorithm (MCL = 1.4). Corresponding functional categories were manually annotated. Source data are provided as a Source Data file.

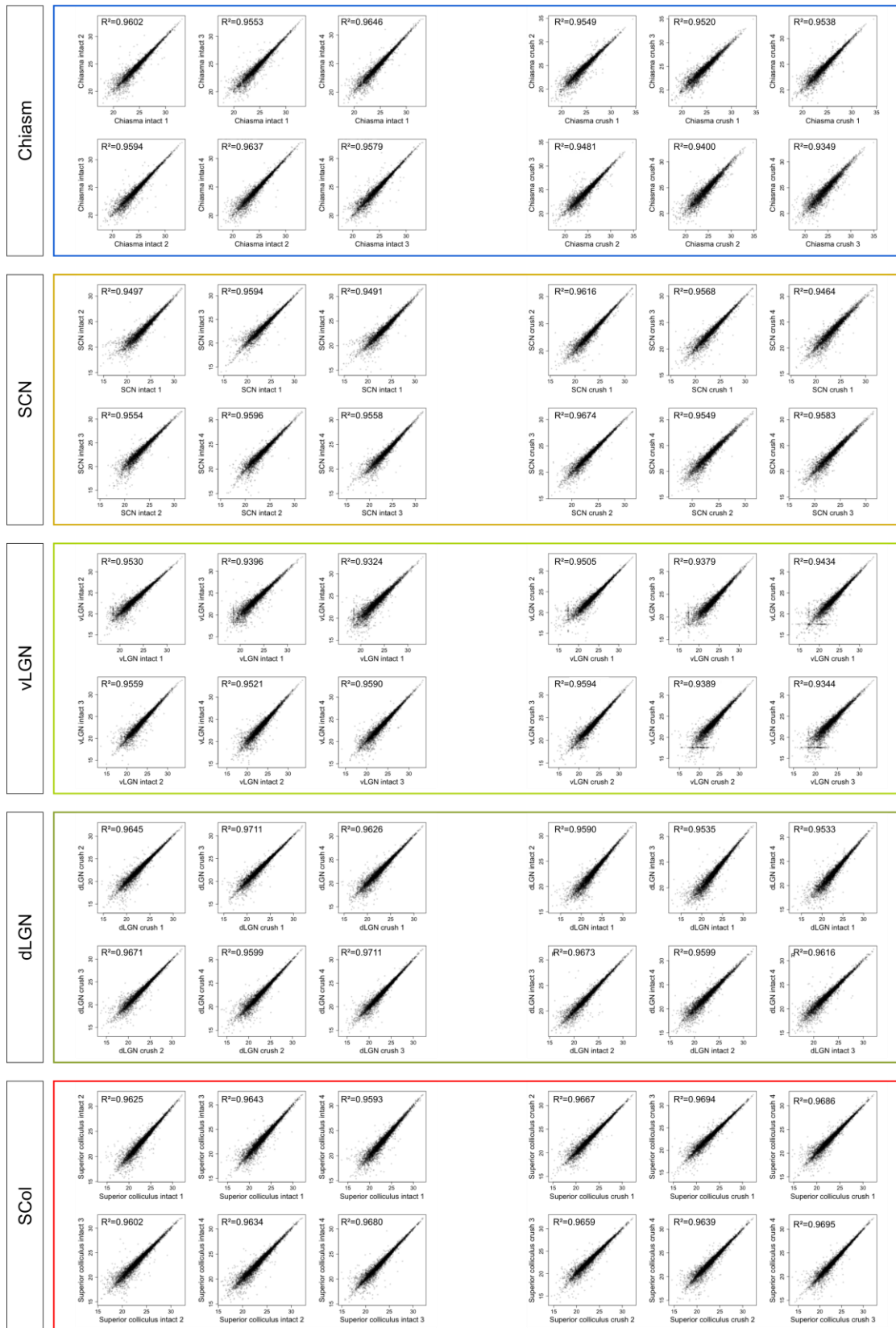
Supplementary Figure 2



Supplementary Fig. 2 Validation of proteomics analysis. a-d Venn diagram representing the shared **a** guidance factors hits, **b** adhesion-related hits, **c** extracellular-matrix-related hits, **d** axon growth and guidance-related hits (number of proteins and percentage of the protein number in the guidance factors, adhesion, extracellular-matrix and, axon growth and guidance categories as defined in **Supplementary Data 2**). In boxes are indicated proteins detected in all visual targets. **e** Epifluorescence images of DCLK2 immunofluorescent labelling in the adult chiasm, SCN, LGN and SCol (colabelled with CTB). Scale bar: 200µm. **e'** Confocal images of DCLK2 and different cell populations markers (GFAP, Iba1, Olig2,

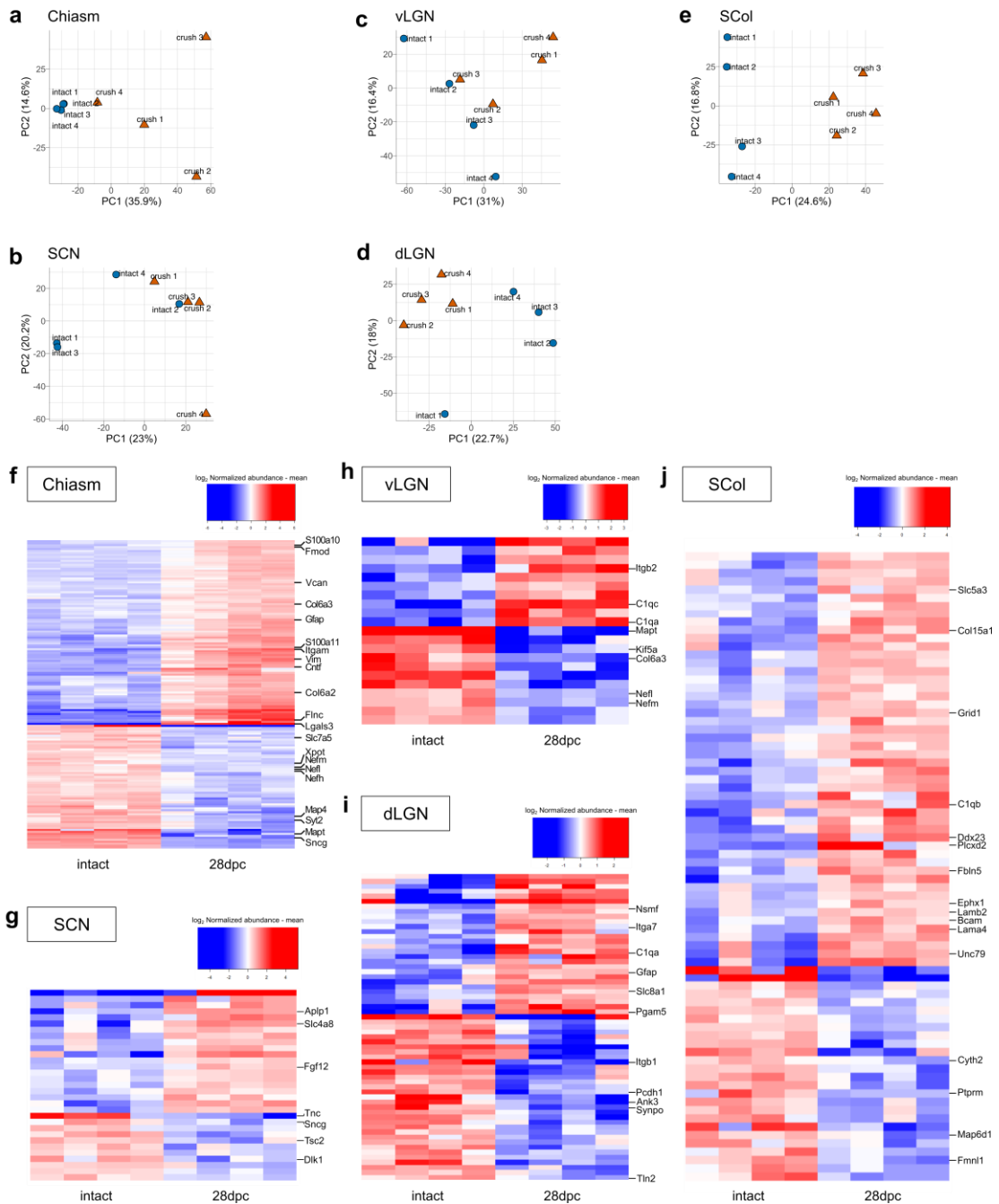
NeuN) in the adult intact chiasm, SCN, LGN and SCol. Scale bar: 50 μ m. All images are representative of N=3 biologically independent animals. **f** Table summarizing the type of cells expressing the guidance molecules of interest.

Supplementary Figure 3



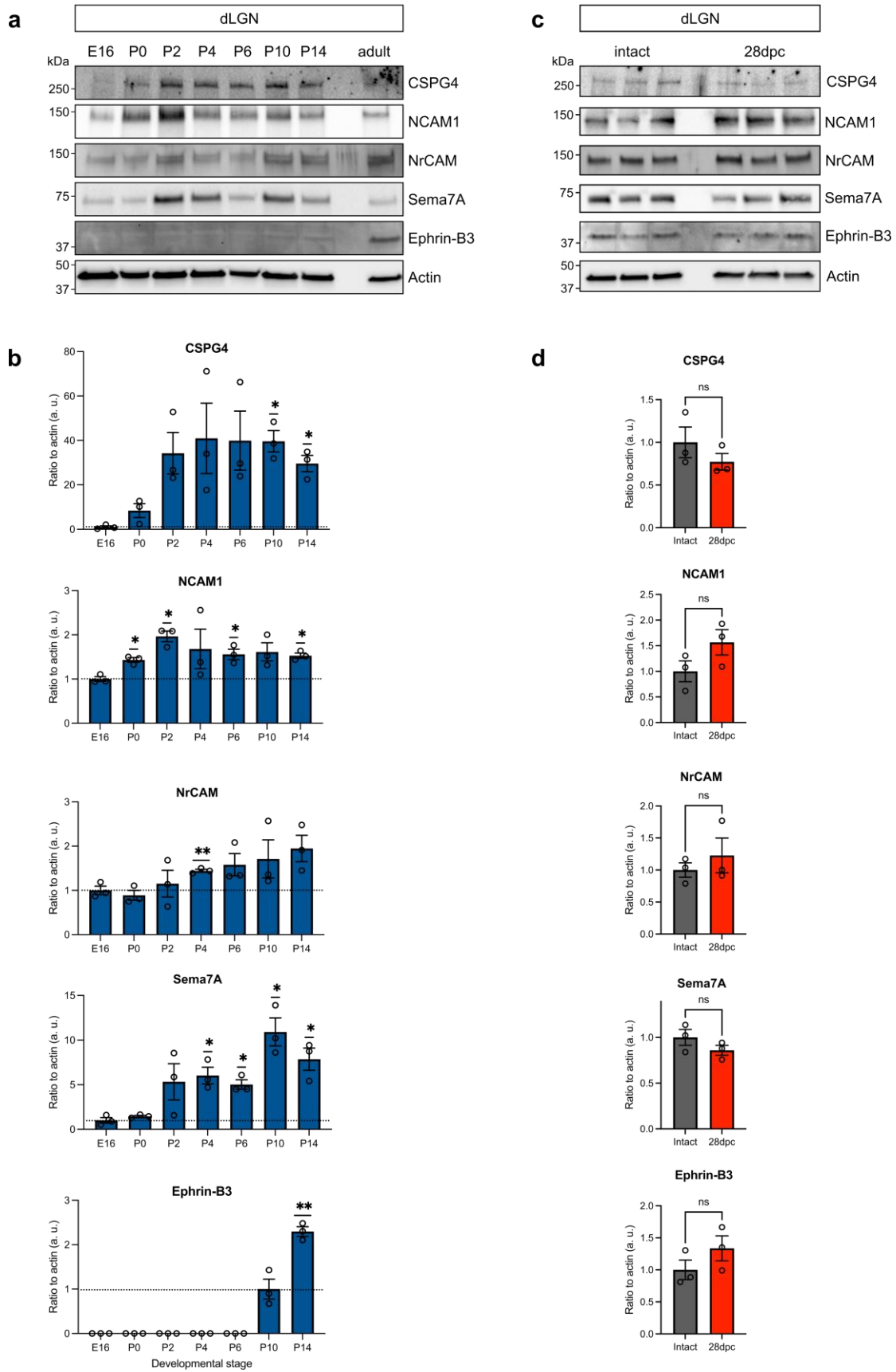
Supplementary Fig. 3 High reproducibility of the experimental design. Scatterplots of protein abundance of the detected hits across replicates, in intact (left) and injured (crush, right) conditions. The Pearson's correlation coefficient is indicated on each plot.

Supplementary Figure 4



Supplementary Fig. 4 Bilateral optic nerve crush causes modifications of the proteome compared to intact. a-e PCA analysis showing a clustering of the replicates according to the condition intact or injured (crush) in each adult visual target. **f-j** Heatmaps showing differentially expressed proteins between injured (crush) and intact conditions. Values are the difference between log₂ normalized abundance of each protein hit and the mean across all samples. For the optic chiasm, proteins with FDR < 1% are represented. For other targets, proteins with FDR < 5% are represented.

Supplementary Figure 5



Supplementary Fig.5 Dynamic of guidance molecules expression during the dLGN development. **a** Western blot analysis of CSPG4, NCAM1, NrCAM, Sema7A and Ephrin-B3 in the dLGN during development. **b** Quantification of Western blot in **a**. N=3 biologically independent animals. Data are presented as mean values +/- SEM. Two-tailed one-sample t-tests to theoretical value = 1, * p-value < 0.05, ** p-value < 0.01. Exact p-values are provided in Source Data file. **c** Western blot analysis of CSPG4, NCAM1, NrCAM, Sema7A and Ephrin-B3 in 3 independent replicates of intact and injured (28dpc) adult dLGN. **d** Quantification of Western blot in **c**. N=3 biologically independent animals. Data are presented as mean values +/- SEM. Two-tailed unpaired Student's t-tests, ns: not significant. Source data are provided as a Source Data file.

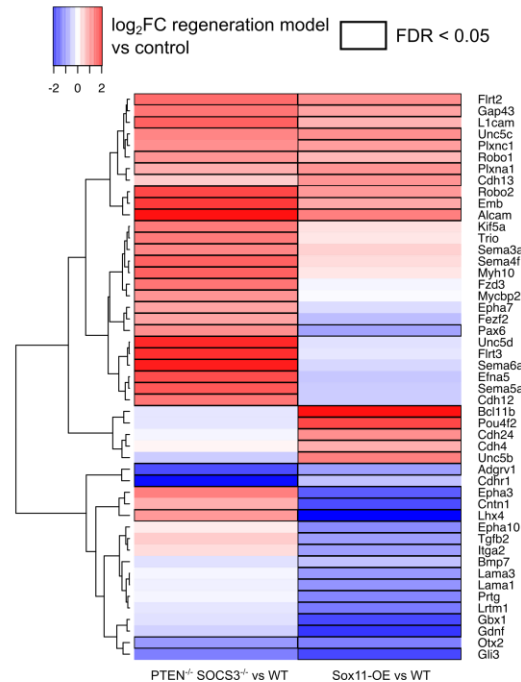
Supplementary Figure 6

a Expression of receptors corresponding to guidance ligands

Ligand	Receptor	Neonatal RGC	Adult RGC	PTEN ^{-/-} SOCS3 ^{-/-} vs WT	Sox11-OE vs WT
Cspg family	Ptprs	40/40	45/45		
	Ptprf	40/40	45/45		↗
	Rtn4r	40/40	45/45	↘	
	Rtn4r1	40/40	45/45		
Efnb3	Epha4	40/40	45/45		
	Ephb2	40/40	45/45		
Ncam1/2	Fgfr1	39/40	45/45		
Ntng1/2	Lrrc4c	40/40	45/45		↗
Sema4a	Plxnb1	40/40	27/45		
	Plxnb2	40/40	45/45		
	Plxnb3				
Sema4d	Plxnb1	40/40	27/45		
Sema7a	Plxnc1	39/40	45/45		↗
	Itgb1	45/45	45/45		

Repulsive interaction ↗ upregulated VS WT
 Attractive interaction ↘ downregulated VS WT
 Not detected

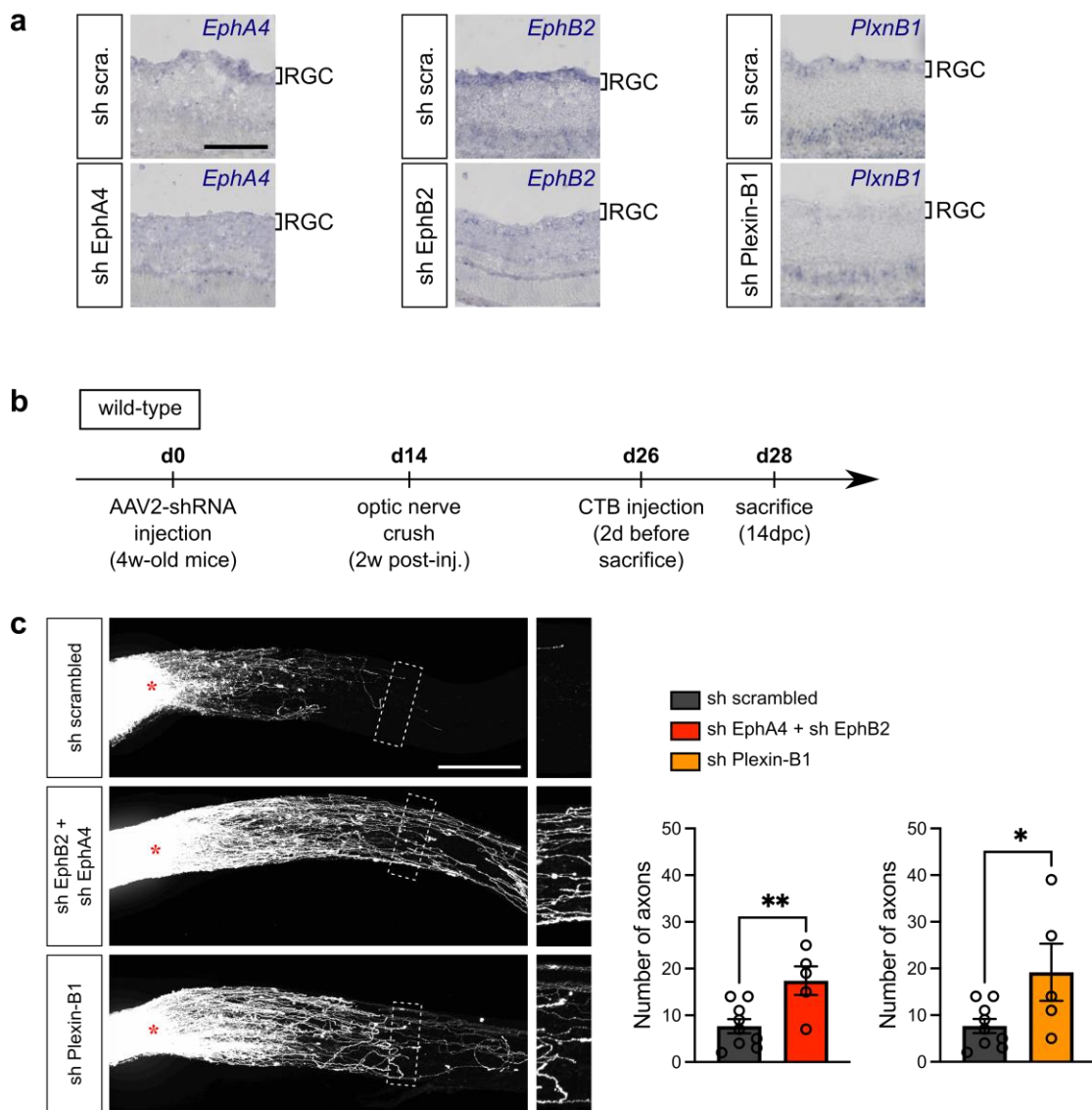
b Differential expression of axon guidance factors and cell adhesion molecules



Supplementary Fig. 6 Screen of guidance factors expressed in RGC in intact and injured conditions.

a Table representing the expression of guidance receptors corresponding to guidance ligands detected in adult visual targets. In red: repulsive interaction, in green: attractive interaction, in grey: not detected. For intact atlases (Neonatal RGC¹ and Adult RGC²), the number of RGC clusters represented is indicated in the boxes. For regenerative datasets (PTEN^{-/-} SOCS3^{-/-3} and Sox11-OE⁴), the variation of the receptor compared to WT (non-regenerative) injured condition is indicated in the boxes if it is upregulated or downregulated (else steady). **b** Heatmap showing the variation of expression of guidance or cell adhesion molecules between regenerative models and WT (injured) condition (PTEN^{-/-} SOCS3^{-/-} and Sox11-OE). The values are log₂ fold-change (FC). The genes with significant FC difference (FDR-adjusted p-value < 0.05) are boxed. Sox11-OE: Sox11overexpressing.

Supplementary Figure 7



Supplementary Fig. 7 Axon regeneration in WT mice upon guidance receptors silencing. **a** In situ hybridization showing EphA4, EphB2, and Plexin-B1 expression in RGC of WT intact retina infected with shRNA scrambled, shRNA EphA4, shRNA EphB2 or shRNA Plexin-B1. Scale bar: 100µm. Images are representative of N=4 eyes. **b** Timeline of the experiment for WT mice. 14 days after shRNA injection, optic nerve crush was performed. 14 days post crush (14dpc), phenotypes were analysed. **c** Whole optic nerve confocal images showing axons labelled with CTB in WT mice injected with AAV2-shRNA at 14dpc, with corresponding quantification of axon number at 750µm from the injury site, indicated by a red star. Sh scrambled: N=9 biologically independent animals. Sh EphA4 + sh EphB2: N=5 biologically independent animals. Sh Plexin-B1: N=5 biologically independent animals. Data are presented as mean values +/- SEM. Two-tailed unpaired Student's ttests, * p-value = 0.0357, ** p-value = 0.0075. Scale bar: 250µm. Source data are provided as a Source Data file.

Supplementary References

1. Rheaume, B. A. *et al.* Single cell transcriptome profiling of retinal ganglion cells identifies cellular subtypes. *Nat Commun* **9**, (2018).
2. Tran, N. M. *et al.* Single-Cell Profiles of Retinal Ganglion Cells Differing in Resilience to Injury Reveal Neuroprotective Genes. *Neuron* **104**, 10391055.e12 (2019).
3. Sun, F. *et al.* Sustained axon regeneration induced by co-deletion of PTEN and SOCS3. *Nature* **480**, 372–375 (2011).
4. Norsworthy, M. W. *et al.* Sox11 Expression Promotes Regeneration of Some Retinal Ganglion Cell Types but Kills Others. *Neuron* **94**, 11121120.e4 (2017).

RESULTATS

Article 2 : Mature axon guidance during central nervous system regeneration

Céline Delpech¹, Julia Schaeffer¹, Noemie Vilallongue¹, Amin Benadjal, Beatrice Blot, Blandine Excoffier, Elise Plissonnier, Floriane Albert, Antoine Paccard, Yvrick Zagar, Valérie Castellani, Stephane Belin, Alain Chédotal, Homaira Nawabi²

¹ Les auteurs ont contribué de manière égale (par ordre alphabétique)

² Lead contact

Les neurones du système nerveux central (SNC) sont incapables de régénérer spontanément suite à une lésion, ce qui se traduit par une perte de fonctions motrices cognitives et/ou sensorielles irréversible. Cependant, la combinaison de modulations de différentes voies moléculaires permet d'obtenir une régénération robuste à longue distance. La plupart de ces études ont été menées sur le modèle du système visuel qui appartient au SNC et la modélisation de la lésion se fait par pincement du nerf optique. Notre équipe a mis au point le modèle de régénération PSM (délétion de PTEN pour activer la voie mTOR, délétion de SOCS3 et surexpression de CNTF pour activer la voie JAK/STAT et surexpression du facteur de transcription c-myc) qui permet aux axones de régénérer au-delà du chiasma optique. Toutefois, ces axones présentent de graves défauts de guidage : ils ne reconnectent pas leurs cibles cérébrales appropriées et peuvent même créer des circuits aberrants qui compromettent d'autant plus le retour des fonctions.

Nous nous sommes focalisés sur une cible des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) particulière : le noyau suprachiasmatique (NSC). C'est la première région du cerveau que les CGR connectent pendant leur développement. Dans notre modèle PSM, on observe que les axones qui régénèrent évitent totalement le NSC. Nous avons tout d'abord mis en évidence la présence de la famille de molécules répulsives Slits dans le NSC. Nous avons également vérifié que les récepteurs de Slits, les Robos soient toujours exprimés par les CGR adultes : les neurones en cours de régénération possèdent la machinerie permettant de répondre à l'action répulsive des Slits. Cependant, il faut vérifier que ligand et récepteur sont toujours capables de communiquer chez l'adulte (là où le guidage n'a plus d'utilité puisque les circuits sont déjà formés et stables). Ainsi, en mettant au point une expérience de co-culture

d'explants rétiniens de notre modèle PSM avec des NSC adultes WT ou déplétés de Slits, nous avons mis en évidence que les axones qui régénèrent sont sensibles aux Slits présents dans le NSC WT et que la délétion de Slit1, Slit2, Slit3 ou Slit1 et Slit2 permet aux axones de pousser dans toutes les directions, même vers le NSC. Nous avons donc choisi de déléter les récepteurs Robos dans les CGR du modèle PSM pour empêcher les axones en cours de régénération de répondre à l'action répulsive des Slits présents dans le NSC. Dans ce modèle appelé PSRR ($PTEN^{-/-} SOCS3^{-/-} Robo1^{-/-} Robo2^{-/-}$), on augmente le nombre d'axones des CGR qui entrent dans le NSC. Nous nous sommes ensuite demandés si la reconnexion du NSC était fonctionnelle. Pour cela, nous avons mis en évidence qu'une exposition de 30 minutes à la lumière activait le gène à expression précoce c-fos dans les neurones du NSC. Nous avons également mis en évidence la présence de synapses entre les axones des CGR et les neurones du NSC.

Enfin, nous sommes actuellement en train de réaliser des expériences de traçage rétrograde qui consiste à injecter le virus de la rage (qui est rétrograde) dans le NSC des souris PSRR. Nous souhaitons ensuite réaliser un marquage sur les rétines de ces animaux pour voir quelles sont les CGR qui ont envoyé leur axone jusqu'au NSC. En effet, la colocalisation du virus de la rage (marqué en vert) et des différents marqueurs des sous-populations de CGR (notamment mélanopsine pour repérer les CGRip) nous permettront de connaître l'identité des neurones qui reconnectent le NSC. Pour finir, nous sommes en train de mener des expériences de comportement basées sur la fonction de régulateur des rythmes circadiens du NSC. En effet, les souris étant des animaux nocturnes, ont une activité la nuit : celle-ci peut être enregistrée grâce à une roue ajoutée dans la cage et branchée à un ordinateur. Nous avons commencé l'enregistrement de souris PSRR (réinnervation du NSC) et PSM (contrôle : évitement du NSC par les axones qui régénèrent) avant et après l'injection des virus (à 4 semaines : injection des virus), au moment de la lésion du nerf optique (à 6 semaines : crush du nerf optique) et après cette lésion. Actuellement, nous observons un décalage de l'activité des souris (PSM et PSRR) qui ne semblent plus différencier le jour et la nuit. Nous continuons les enregistrements et espérons observer une correction des rythmes d'activité pour les souris PSRR dont le NSC est reconnecté, mais pas pour les souris PSM contrôles.

Ainsi, grâce à cette étude, nous montrons l'importance du guidage axonal dans la régénération qui est essentiel pour permettre la reformation des circuits neuronaux et le retour des fonctions.

J'ai grandement participé à cette étude, bien qu'elle ait commencé avant mon arrivée dans le laboratoire. En effet, j'ai réalisé toutes les hybridations in situ présentées dans les différentes figures (NBT-BCIP et fluorescentes), j'ai mis au point la chirurgie stéréotaxique

dans le laboratoire (permettant la modulation de l'expression des Slits dans le NSC ainsi que le traçage rétrograde et l'injection de CTB dans le chiasma optique) et ai réalisé les microdissections de NSC pour les cocultures ex-vivo, j'ai participé aux chirurgies pour les phénotypes PSRR, à l'expérience nocturne c-fos, à la mise en place de l'expérience de comportement, à la perfusion des animaux, à la transparisation des tissus ou à leur coupe, aux marquages d'immunofluorescence, aux prises d'images (épifluorescence et confocal), à l'analyse et à la mise en forme des résultats, figures et schémas.

Cette étude va se terminer prochainement, notamment avec les résultats du traçage rétrograde et du comportement. Nous souhaitons l'envoyer ensuite à un journal pour publication.

Mature axon guidance during CNS repair

Céline Delpech^{1*}, Julia Schaeffer^{1*}, Noemie Vilallongue^{1*}, Amin Benadjal, Beatrice Blot¹,
Blandine Excoffier¹, Elise Plissonnier¹, Floriane Albert¹, Antoine Paccard¹, Yvrick Zagar³,
Valérie Castellani², Stéphane Belin¹, Alain Chédotal³, Homaira Nawabi¹⁺

1 Univ. Grenoble Alpes, Inserm, U1216, Grenoble Institut Neurosciences, 38000 Grenoble,
France

2 Institut NeuroMyoGène - CNRS UMR 5310 - INSERM U1217 de Lyon- UCBL Lyon 1, Faculté
de Médecine et de Pharmacie, Lyon, France

3 Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, Paris, France.

* These authors contributed equally to the work (alphabetical order)

+ Lead contact: homaira.nawabi@inserm.fr

Abstract

Reconstructing mature/functional neuronal circuits remains a big challenge in the axon regeneration field. Unlike developing neurons, mature neurons from the central nervous system (CNS) fail to regenerate leading to irreversible loss of motor, sensitive and/or cognitive functions. The past years brought many excitements as long-distance axon regeneration has been achieved by modulating the intrinsic growth capabilities of mature CNS neurons. However, functional recovery remains limited by guidance defects made by regenerating axons. We previously showed that co-activation of mTOR, JAK/STAT and c-myc pathways within retinal ganglion cells (RGC) induces unprecedented long-distance regeneration. Here, we used this model to characterize the projections of regenerating axons in the optic chiasm and in the suprachiasmatic nucleus (SCN). We show that regenerating axons specifically avoid the SCN, whether intact projections remain (unilateral optic nerve injury) or whether it is fully denervated (bilateral optic nerve injury). A forward expression screen, showed that in adult mice, the repulsive axon guidance cues of the Slit family are expressed in the SCN and their receptors, Robo1 and Robo2, in RGCs. The modulation of Slit/Robo interaction allows us to modify the trajectory of regenerating axons towards their target. Finally, we have emerging clues of the functionality of the newly rebuilt circuit.

Introduction

In adult mammals, central nervous system (CNS) axons are unable to regenerate spontaneously after a lesion. This leads to permanent and irreversible loss of motor and/or cognitive functions in the context of neurodegenerative diseases or following traumatic injuries. Two main reasons underlie this regenerative failure. First, a number of repulsive and growth-inhibitory factors – eg myelin debris or components of the glial scar - are expressed at the lesion site, impairing the potential for axon regrowth. However, their genetic or pharmacological inhibition only improve axon regeneration slightly (Lee et al. 2010). Second, intrinsic properties of adult neurons impede regeneration. Indeed, the modulation of specific developmentally or injury-regulated molecular pathways, such as mTOR or JAK/STAT, enhances neuronal growth capacities and unlocks CNS regeneration (Park et al. 2008; Smith et al. 2009). Moreover, the combination of several signaling pathways leads to long distance regeneration, for example in the visual system where regenerating axons are able to grow from the eye ball to the brain (Belin et al., 2015; Lim et al., 2016; Sun et al., 2011).

However, most of the regenerating axons fail to connect to their proper targets, preventing functional reconnection of the circuit. The minimum number of regenerating axons needed to connect the post-synaptic neurons to reactivate a circuit has not yet been established. Moreover, aberrant axonal projections could form deleterious circuits that potentially counteract functional recovery attempts. For example, the overexpression of the transcription factor Sox11 in the corticospinal neurons improves the regeneration of the corticospinal tract, but the behavioral outcome worsens compared to control (Z. Wang et al. 2015). Interestingly, several studies have highlighted that regenerating axons are misguided and therefore cannot reconstruct the circuit as it was formed during development (Crair & Mason, 2016). For example, in the visual system, regenerating retinal ganglion cells (RGC) axons misproject to the contralateral eye, get lost in the optic chiasm or make U-turns (Luo et al., 2013; Pernet et al., 2013a, 2013b; Belin et al 2015; Wang et al., 2020).

During development billions of axons navigate along specific pathways to reach and connect with their appropriate targets. Their routes are strictly defined by the specific expression of guidance cues at key locations where axons choose their trajectory (Stoeckli 2018). Intermediate targets such as the optic chiasm or the floor plate are well-studied examples of these crucial decision-making points where ipsi- and contralaterally-projecting axons are sorted (Nawabi & Castellani, 2011). In the developing visual system, specific RGCs populations project their axons through the optic nerve to more than 40 brain areas. Most of the topographic maps are well defined as well as their timing of formation (Seabrook et al. 2017). For instance, ipsilateral projecting RGC originate specifically from the ventro-temporal region of the retina and are born around E14.5. During their journey to their final targets, they travel along contralateral axons of RGC born sooner and sending their axon throughout the optic nerve from E11 (Colello et Guillery 1990; Dräger 1985; Guillery, Mason, et Taylor 1995; Marcus et Mason 1995).

In contrast, in the context of axon regeneration, the identity of all RGC is already acquired and they have to grow their axons *de concert* regardless of their original organization. Moreover, whether mature axons still retain the molecular machinery to respond to external guidance cues remains an open question. If they do, will they recapitulate the behavior of embryonic axons? While mature axons have long been thought to lack growth cones, activation of regenerative programs results in formation of a growth cone in regenerating axons (Nawabi et al. 2015). Hence this crucial question stands today in the field of CNS repair: are axon guidance mechanisms required and integrated in mature CNS neurons to ensure proper regeneration and functional circuit formation?

To answer this question, we used a long distance model of regeneration in the mouse visual system by co-activating mTOR, JAK/STAT and c-myc pathways in RGC (Belin et al. 2015). Even though robust regeneration is achieved up to the brain, regenerating axons present strong guidance defects that are exacerbated in the vicinity of the optic chiasm and in the region of the suprachiasmatic nucleus (SCN). Conducting a forward expression screen of

canonical guidance cues, we found that the SCN expressed Slit repellents, whether in intact condition or in full denervation. Using combined ex vivo and in vivo approaches, we observed that the regenerating axons are repelled by Slits and that modulation of the Slit signaling pathway allows axons to enter the SCN and form a functional circuit. For the very first time we provide the proof of concept of axon guidance processes during regeneration in mature CNS.

Results

Long distance regenerating axons present guidance defects

Axon regeneration is now possible through the modulation of neuronal intrinsic capabilities. However growing axons, regardless of the activated molecular pathway show guidance defects (Crair et Mason 2016; Lim et al. 2016; Luo et al. 2013; Vincent Pernet et Schwab 2014). We focused our work on a model of long-distance regeneration in the visual system through the simultaneous activation of mTOR (by deleting PTEN), JAK/STAT (by deleting SOCS3 and overexpressing CNTF) and c-myc overexpression (Belin et al. 2015). Hereafter we will call this combination of pathways the PSM model of regeneration (standing for PTEN/SOCS/MYC).

First, we sought to analyze the projections of regenerating axons through the optic chiasm and in the most proximal primary target of RGC: the suprachiasmatic nuclei. To do so, we performed unilateral optic nerve crush and used cholera toxin B (CTB) tracing and performed tissue clearing four weeks later (Figure 1A-B). In an intact visual system, 95% of RGC axons project across the midline to the contralateral visual tract, while 5% project into the ipsilateral tract (Mason & Slavi, 2020). Following injury, we found that some regenerating axons invade the contralateral optic nerve (13%) (Figure S1A-B), while others enter the optic tract and project contralaterally (13%) or ipsilaterally (45%) (Figure 1A-B). In addition, some axons invade randomly the optic chiasm or enter into the brain outside of the optic tracts.

Strikingly, among the regenerating axons that reach the optic tracts, a higher proportion project dorsally into the ipsilateral optic tract (61%), while only 39% are able to enter into the ipsilateral

tract itself (Figure S1C-D). On the other hand, the majority of regenerating axons are able to enter the contralateral optic tract (83%) (Figure S1A). This difference could be explained by the presence of intact axons (95%), from the non-lesioned eye, into the ipsilateral optic tract that may “occupy the space” and prevent regenerating axons from entering the tract. Conversely, the small proportion of intact axons (5%, from the intact eye) remaining in the contralateral optic tract probably allows the regenerating axons to enter it.

Next, we asked whether the observed guidance defects are due to the presence of intact axons from the contralateral eye. Indeed, in most of models of regeneration, optic nerve injury is performed unilaterally. Therefore, we primed RGC for regeneration in one eye (by AAV2-Cre, AAV2-CNTF and AAV2-c-Myc intravitreal injection), leaving the other eye wild-type (WT), and performed bilateral optic nerve crush. In this experimental setting, one optic nerve degenerates while there is axon regeneration in the other one. We analyzed the projection patterns of regenerating axons, labelled with CTB, four weeks post-injury (Figure 1C-D). In the unilateral condition, 13% and 45% of regenerating axons project to the contralateral and ipsilateral side, respectively. Upon bilateral optic nerve injury, 27% of axons project to the contralateral side and 37% in the ipsilateral side. Accordingly, we observed a higher proportion of regenerating axons that crossed the midline towards the contralateral side when both optic nerves are crushed (Figure S1B-D).

Given these results, we examined whether this abnormal ipsi- versus contralateral pattern of projection could compromise the innervation of visual axon targets in the brain which in most cases are innervated by both eyes. To address this question, we focused on the most proximal brain target of RGC axons: the suprachiasmatic nucleus (SCN) (Bedont & Blackshaw, 2015). It has been reported that the SCN receives equal innervation from both eyes (Fernandez et al. 2016) (Figure 1D; Figure S1F-G). In our PSM model, after a unilateral nerve crush, we observed robust innervation of the SCN from intact axons but very few regenerating axons enter the SCN (about 4% of regenerating axons) (Figure 1D; Figure S1F-G). Interestingly, when both optic nerves are injured, regenerating axons still fail to enter the SCN (less than

3%). We also observed a small proportion of regenerating axons growing between the two nuclei, suggesting that they avoid them (Figure 1D; -Figure S1F-G). Together, our results suggest that physical cluttering is not the main reason for which regenerating axons fail to enter the correct tract or brain target. This suggests that some intrinsic mechanisms control brain target innervation and circuit formation during regeneration.

ipRGC survive and regenerate upon optic nerve injury in PSM model of regeneration

Despite the robust regeneration obtained in the PSM model, regenerating RGC axons fail to innervate the SCN. Thus, we investigated the injury response of intrinsically photosensitive RGCs (ipRGCs) which normally innervates the SCN. ipRGCs express the melanopsin photopigment. Among ipRGCs, only the M1 subpopulation, characterized by a high expression of melanopsin and a lack of *Brn3b*, innervates preferentially the SCN (Chen, Badea, et Hattar 2011). First, we analyzed ipRGC survival upon optic nerve injury. We performed melanopsin immunostaining on retina sections in intact and regenerating conditions, at different time-points after optic nerve injury, in the PSM model (Figure S2A). We found that RGC expressing melanopsin (all ipRGCs) including RGC M1-ipRGCs, survived well even 28 days after injury (76% and 95% of melanopsin neurons surviving, respectively, no statistically significant difference) (Figure S2A). In other models of regeneration or even in WT animals, it has been shown that ipRGCs have a great resilience to injury (Bray et al. 2019; Duan et al. 2015; Tran et al. 2019). Our results confirm this is also the case in the PSM model.

Next, we addressed ipRGCs ability to regenerate. To do so, we performed 2 complementary experiments: first, we crossed *PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl}* mice with *OPN4-GFP* mice, in which the green fluorescent protein (GFP) is specifically expressed under the melanopsin promoter *OPN4* (Figure S2B). Second, we back-traced melanopsin positive RGCs by injecting CTB in the optic chiasm (Figure S2C). In both cases, four weeks after optic nerve injury (28 days post-injury), we observed GFP-positive (GFP⁺) axons growing within the optic nerve (Figure S2B) and CTB⁺

RGCs in the retina. The proportion of regenerating ipRGCs matches the original number of ipRGCs found in intact condition (Figure S2B). Together, these results confirm that ipRGCs survive and regenerate after injury, but are unable to grow back into the SCN. We hypothesized that this could involve repulsive axon guidance molecules.

Axon guidance cues are expressed in the SCN

During development, axon guidance molecules expressed by target cells or by cells at critical choice-points instruct growing axons on their trajectory (Stoeckli 2018). In mammals, guidance cues are still expressed in the adult brain but their expression pattern differs from embryonic stages (Ellezam et al. 2001; Liebl et al. 2003; Marillat et al. 2002). Surprisingly, not much is known about axon guidance cues expression within the SCN. To uncover potential regulators of regenerating RGC axons, we performed a molecular screen of guidance cues in the SCN. We focused on the guidance cues which are known to control axon guidance within the optic chiasm, the region closest to the SCN during development. We found that some guidance cues are not expressed in the SCN, such as the attractive guidance cue Netrin-1 and Sfrp2 (Figure S3A). Others are expressed in the adult SCN, such as EphB1, Sfrp1 and VEGF. However, these cues display a level of expression similar to surrounding tissues, suggesting that they are not enriched in the SCN (Figure S3A). On the other hand, *Slit1*, *Slit2* and *Slit3* mRNAs were highly expressed in the SCN (Figure S3A). We next focused on Slits, as they are known to repel RGC axons during development. This feature is of high interest in our model because we observed that regenerative RGC axons avoid the SCN. Moreover, the inactivation of *Slit1* and *Slit2* or their receptor Roundabout 2 (*Robo2*) during development leads to RGC axon guidance defects which phenocopy what we observed in adulthood during regeneration (Plump et al. 2002). Indeed in *Slit1/Slit2* double knockouts (KO) and *Robo2* KO RGC axons enter the contralateral optic nerve or randomly project within the optic chiasm (Plachez et al. 2008; Plump et al. 2002). We confirmed the expression of Slits mRNA and proteins by qRT-PCR (Figure S3B).

It has been shown that CNS lesions can induce an upregulation of repulsive guidance cues at the injury site (eg. Sema3A after spinal cord injury (Ueno et al., 2020) or Ephrin-A5 ligand after cortex stroke (Carmichael et al. 2005). In contrast, the guidance landscape within visual brain targets distal to the lesion remains steady (Vilallongue et al. 2021). Thus, we asked whether denervation of the SCN could affect Slits expression. We performed FISH-IF on brain sections in intact condition and 28 days post-bilateral optic nerve injury. We found that the expression of *Slit1* and *Slit2* in the SCN is not affected by optic nerve crush (Figure 2A and S3B-C). We further confirmed these results by performing qRT-PCR on intact and denervated adult SCN tissues after microdissection (Figure S3B). This suggest that Slit family members could influence SCN reinnervation in the context of regeneration.

We then analyzed, the expression of Robo1 and Robo2 within RGC in the PSM model. During development of the visual system, Robo2 is the main Slit receptor in RGCs (Plachez et al. 2008). Using in situ hybridization, we found that Robo1 and Robo2 mRNA are expressed in WT RGC and in RGC in the PSM model, with Robo2 showing a stronger expression (Figure S3C-D). We also found that this expression is maintained 3 days after injury of optic nerve (Figure S3D). Furthermore, we asked whether these receptors are present in melanopsin positive RGC. Using FISH-IF we found that ipRGC express these receptors suggesting that ipRGC could be responsive to Slits (Figure S3D). Then, we asked whether Robo1/2 receptors are present at RGC growth cones, where guidance decisions take place (Dickson 2002). To address this question, we cultured adult retina explants from PSM mice (Schaeffer et al. 2020). We combined immunostaining for Robo1 or Robo2 with anti-Tuj1 and phalloidin staining to label growth cones (Figure S3E). We found an enrichment of Robo receptors at axon terminals and within growth cones. These results suggest that regenerating axons have the tools needed to integrate guidance signaling at the growth cone.

Regenerating RGC axons are repelled by Slits

Axon guidance is a mechanism used by growing axons to find their path to reach their post synaptic partners. In a mature steady state CNS, this feature is probably not required anymore

(Glasgow, Ruthazer, et Kennedy 2021). However, the question of axon guidance rises when it comes to regeneration. Our results above show that guidance cues and their receptors are expressed by adult neurons. To determine if Slit/Robo signaling could mediate the avoidance of SCN by regenerating RGC axons, we used an ex-vivo model of mature visual system culture (Schaeffer et al. 2020). PSM retina explants were cultured in collagen gel with wild type adult SCN or mature SCN depleted from Slits (Figure 2B-D). When cultured with WT SCN, axons coming from the explant, grow away from the SCN, mimicking the in vivo observations. Then, we asked whether Slits are involved in SCN repulsive activity. To address this question, we used Slit1^{-/-}, Slit3^{-/-} SCN and AAV-Cre were injected in the SCN of Slit2^{fl/fl} and Slit1^{-/-}/Slit2^{fl/fl} to obtain Slit2^{-/-} and Slit1^{-/-}Slit2^{-/-} (Slit1^{-/-} Slit2^{-/-} Slit3^{-/-} mice were not viable) (Figure 2B). In contrast to WT SCN, the absence of Slit1, Slit2 or Slit3 led to the loss of SCN repulsive activity (Figure 2C-D). The simultaneous inactivation of both Slit1 and Slit2 also abrogated repulsion. Indeed, in these conditions, some RGC axons are now growing toward the SCN (Figure 2C-D).

This result suggest that SCN-derived Slits repel regenerating RGC axons as efficiently as embryonic ones (Brose et al. 1999; Plump et al. 2002).

Inactivating Slit /Robo signaling improves SCN reinnervation by regenerating RGC axons

In order to investigate the contribution of Slit/Robo signaling in axonal pathfinding during regeneration, we crossed the *PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl}* mice with the *Robo1^{-/-}/Robo2^{fl/fl}* mice, where Robo1 expression is knocked out and Robo2 can be deleted upon expression of the Cre recombinase. AAV2-Cre intravitreal injection allowed us to inactivate Robo2 expression specifically in RGCs. Four week-old *PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl}* and *PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl}/Robo1^{-/-}/Robo2^{fl/fl}* mice received unilateral intravitreal injection of AAV2-Cre, AAV2-CNTF and AAV2-c-myc. Two weeks later, both optic nerves were injured to obtain full denervation of the SCN. Four weeks later, regenerating axons trajectories were visualized by intravitreal injection of CTB-Alexa555. We performed tissue clearing and 3D-imaging to analyze RGC axon distribution along the optic

tracts (Figure 3A). We found that a significant number of Robo1/2-depleted axons enter the SCN compared to control (PSM) condition (Figure 3A-B). We next asked whether Robo1/2-depleted ipRGC axons were able to enter the SCN. We crossed *PTEN^{ff}/SOCS3^{ff}/Robo1^{-/-}/Robo2^{ff}* with the OPN4 mice line. We found GFP+ axons within the SCN confirming that ipRGC were able to connect their original brain target (Figure 3C). We also checked the implication of a single deletion of Robo: we focused on the regenerating phenotype in the PSM model depleted from Robo1 alone or Robo2 alone. It seems that the deletion of both Robos is more efficient than a single one (Figure S4A-B). Moreover, staining with specific synaptic markers (PSD95 and Vglut2) shows that regenerating axons entering the SCN form synapses (Figure 4A-B).

Innervation of SCN by regenerating axons controls its activity by light

We next investigate the functionality of this circuit. First, we studied the expression of the immediate early gene c-fos, which is known to increase transiently upon neuronal activation (Figure 4C). When WT animals are kept in dark or upon bilateral optic nerve injury, no c-fos expression is detected in the SCN (Figure S5A-B). Intact WT animals show a strong increase of c-fos expression when animals are exposed to light (Figure S5A-B). Interestingly, in *PTEN^{-/-}/SOCS3^{-/-}/Robo1^{-/-}/Robo2^{-/-}* there is a significant increase of c-fos activation compared to *PTEN^{-/-}/SOCS3^{-/-}/Robo1^{+/+}/Robo2^{+/+}* or *PTEN^{-/-}/SOCS3^{-/-}/Robo1^{+/-}/Robo2^{+/-}* (Figure 4D-F). This shows that this regenerated RGC-SCN circuit is functional.

Discussion

Axon regeneration in the CNS has been unlocked when the contribution of neuronal intrinsic capabilities was discovered (Park et al., 2008; He & Jin 2016). Since then, long-distance regeneration has been achieved through combinatorial approaches (Belin et al. 2015; Lim et al. 2016; de Lima et al. 2012). Yet, functional recovery still remains challenging. Indeed, most

regeneration models display strong projection defects of regenerating neurons that compromise their connection to their proper target. In this case, either an aberrant circuit is formed (Z. Wang et al. 2015), or too few axons reach the target and therefore cannot sustain activation of the neuronal circuit. In both cases, functional recovery is compromised (Lim et al. 2016; Z. Wang et al. 2015). Given the strong axon guidance defects, we explored the hypothesis that regenerating axons could be guided in the mature CNS to improve targeting to their original targets. Axon guidance is a mechanism that controls neuronal circuit patterning during development. In the mature CNS, this process is not necessary anymore, with for example progressive decrease of plasticity as the CNS ages and closure of critical periods (Fawcett 2009). Therefore, the pattern of expression of many guidance cues is reset in mature CNS and differs from development. Moreover, the sensitivity of regenerating CNS axons to guidance cues and their ability to integrate these signals is unknown.

Intact axons impair axon guidance of regenerating axons

In order to address axon guidance mechanisms during regeneration, we used the co-activation of mTOR, JAK/STAT and c-myc pathways as a long-distance regeneration model (Belin et al. 2015). As a starting point, we analyzed in depth the projection phenotypes of regenerating axons in this model. In most experiments addressing axon regeneration, optic nerve injury is performed unilaterally (Belin et al. 2015; Lindborg et al. 2021; Park et al. 2008; X.-W. Wang et al. 2020) keeping the contralateral axons intact. In our experiments we observed that these intact axons act as a physical barrier and prevent axons from crossing the midline and enter the ipsilateral optic tract. Thus, we lesioned both optic nerves and induced regeneration in one eye. While the distribution of ipsi- versus contralateral projections is highly abnormal in both unilateral and bilateral optic nerve injury, we observed that removing axons from the contralateral eye changes the projection pattern of regenerating axons. In particular it improves midline crossing and the entry into ipsilateral optic tract. These results reveal an unexpected feature that needs to be considered when it comes to address CNS repair: intact axons might prevent regenerative axons from reaching their original targets, specifically when their paths overlap. This effect on the guidance of regenerative axons could have several explanations.

First, as intact contralateral axons are myelinated, they could act as a growth-inhibitory substrate unable to support axon regrowth (Chaudhry & Filbin, 2007; Silver et al., 2015). A second hypothesis could be the cluttering of space and modification of the stiffness of the tissue. As contralateral axons form a tight bundle, they could act as a physical, mechanical barrier that influences axon growth beyond the chemical guidance (Franze, Janmey, et Guck 2013). During visual circuit formation over the course of development, axons from both eyes grow in a symmetrical manner and through several waves (Seabrook et al. 2017). Only when axons reach their targets does myelination occur (Monje 2018). In this context growing axons have enough room to extend, which is different in the mature CNS, with partial injury of the circuit.

Axon regeneration of ipRGC

As we aim to address axon guidance mechanism during regeneration, we chose to address the innervation of the SCN as it is the most proximal brain target to the lesion site. Moreover, a very well-characterized subpopulation of RGC connect directly to the SCN: the M1-ipRGC (Chen, Badea, et Hattar 2011). In our model of regeneration, we observed that ipRGC survive well upon axon lesion, even after 4 weeks, which is in accordance with previous studies (Bray et al. 2019; Duan et al. 2015; Tran et al. 2019). Moreover, we observed their ability to regenerate, as reported in different studies (Bray et al. 2019; Lim et al. 2016). Indeed, it has been described that melanopsin maintain the mTOR activation in ipRGC, increasing their survival, and its overexpression promotes their regeneration (Li et al. 2016). However, it has also been previously reported that the OPN4 promoter is downregulated after axon injury (Nadal-Nicolás et al. 2015), thus the analysis of ipRGC regeneration in OPN4-GFP/PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl} mice might induce some bias towards an underestimation of the number of ipRGC regenerating axons. In order to circumvent this, it would be interesting to back-trace these axons to the retina by injecting CTB to the distal end of the optic nerve and the chiasma region.

Yet, despite good survival and regeneration of ipRGC, we observed that regenerating axons completely avoid the SCN. This was the case whether the contralateral eye is kept intact or not, which in the latter situation results in complete denervation of RGC primary brain targets. Hence, we concluded that physical cluttering is not at play in the case of SCN avoidance. Our hypothesis is that the SCN expressed guidance molecules actively influencing axon growth away from it.

Expression of axon guidance cues in the CNS

Next, we used a candidate approach to decipher the guidance molecules' identity expressed in the SCN. We focused on the cues that are involved in guidance of developing RGC axons during decision-making at the optic chiasm. We found that some of them are expressed in the region of the SCN, such as EphB1, Sfrp1 or VEGF, while others are not or weakly expressed, such as Netrin or Shh. Interestingly, the expression level of most of guidance cues is not modulated by denervation of the SCN. Guidance cues' expression in the paradigm of regeneration has been almost exclusively studied at the injury site. Upon injury of the CNS, a glial scar forms at the lesion site and some guidance cues that influence axon growth get upregulated, such as Ephrins, Slits, Semaphorins (Mueller et al. 2006; Vincent Pernet et Schwab 2014; Roig-Puiggros et al. 2020). On the other hand, the regulation of guidance cues in denervated areas at a distance from the injury site has been poorly studied. Recently, our proteomics study revealed that even though denervation affects the proteome of RGC brain targets (SCN, lateral geniculate nucleus, superior colliculus) and of the optic chiasm, the expression of guidance cues was not affected at all (Vilallongue et al. 2021). Similarly, in this study, we observed the same steadiness at the level of the mRNA for most of guidance cues in the SCN. Our results suggest that guidance cues' expression pattern in adulthood is not modulated upon injury. Their pattern of expression is established during maturation of the circuit and remains steady through adulthood and beyond injury (Vilallongue et al. 2021). Guidance cues expressed in brain targets may participate in the innervation of these regions by regenerative axons, for example the repulsive Slit family members Slit1 and Slit2.

Slit/Robo modulation improves entry of regenerating axons in the SCN

Our results suggest that Slits expressed in the adult SCN retain their repulsive activity (Brose et al. 1999; Kidd, Bland, et Goodman 1999), thereby influencing regrowth of regenerating axons that respond to them and repelling them away from their target. We confirmed that PSM RGC express the canonical Slit receptors Robo1 and Robo2, possibly integrating Slit signaling via them. Indeed, using modulation of Robo1 and Robo2 receptors in RGC of the PSM model, we observed that regenerating axons can enter the SCN, when they completely avoid it in PSM controls. Interestingly, this phenotype displays an asymmetry with a strong preference for the ipsilateral nucleus, suggesting that Robo modulation also influences symmetrical innervation of the SCN. As the development of the SCN is poorly studied, it would be interesting to investigate the role of Slit/Robo in the symmetrical branching and innervation during development.

Finally, we have proofs of a functional reinnervation of the SCN with the c-fos expression upon light exposure as well as synaptic marker expression. Back-tracing of SCN-invading fibers would allow us to verify that regenerating ipRGC have indeed grown back into the SCN. Behavioral study of light/dark response of animals could be done to demonstrate the functionality of this newly reformed circuit. Nonetheless, our results show for the first time that regenerating axons in long-distance regeneration models have the capacity to be guided back to their original target, provided that (i) guidance landscape is characterized in-depth in the mature SCN, (ii) the modulation of relevant receptors does not impair other functionalities of the circuit, and (iii) the time window is accurately defined to design a transient modulation of the guidance signaling in order to resume reinnervation of the proper targets.

Material and Methods

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		

Chicken polyclonal anti-GFP antibody	Abcam	Cat# ab13970; RRID: AB_300798
Goat polyclonal anti-Vglut2 antibody	Abcam	Cat # ab178538
Guinea polyclonal pig anti-RBPMS antibody	Millipore	Cat# ABN1376; RRID: AB_2687403
Mouse monoclonal anti-tubulin β 3 (TUJ1) antibody	Biolegend	Cat# 801202; RRID: AB_10063408
Mouse monoclonal anti-PSD95 antibody	Abcam	Cat# ab2723 ; RRID : AB_303248
Rabbit polyclonal anti-VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) antibody	Immunostar	Cat# 20077; RRID: AB_572270
Rabbit monoclonal anti-c-fos antibody	Cell Signaling Technology	Cat# 2250 ; RRID : AB_2247211
Rabbit polyclonal anti-melanopsin antibody	Abcam	Cat# ab19306; RRID: AB_444842
Rabbit polyclonal anti-Robo1 antibody	Abcam	Cat# ab85312 ; RRID : AB_2238648
Rabbit polyclonal anti-Robo2 antibody	Abcam	Cat# ab75014 ; RRID : AB_1861203
Donkey anti-rabbit IgG (H+L) highly cross-absorbed secondary antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Scientific	Fisher Cat# A-21206; RRID: AB_2535792
Donkey anti-rabbit IgG (H+L) highly cross-absorbed secondary antibody, Alexa Fluor 647	Thermo Scientific	Fisher Cat# A-31573; RRID: AB_2536183
Donkey anti-chicken IgY (IgG) (H+L) antibody, Alexa Fluor 488	Jackson ImmunoResearch Labs	Cat# 703-545-155; RRID: AB_2340375
Donkey anti-guinea pig IgG (H+L), Alexa Fluor 647	Jackson ImmunoResearch Labs	Cat# 706-605-148; RRID: AB_2340476
Donkey anti-goat IgG (H+L), Alexa Fluor 488	Thermo Scientific	Fisher Cat# A11055 ; RRID : AB_2534102
Donkey anti-mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 647	Thermo Scientific	Fisher Cat# A31571 ; RRID_162542
Donkey anti-mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 568	Thermo Scientific	Fisher Cat# a10037 ; RRID : AB_2534013
Bacterial and virus strains		
AAV2-Cre	Belin et al., 2015	N/A
AAV2-CNTF	Belin et al., 2015	N/A
AAV2-c-myc	Belin et al., 2015	N/A
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
Cholera toxin B subunit (CTB)-Alexa 488	Thermo Scientific	Fisher Cat# C34775
Cholera toxin B subunit (CTB)-Alexa 555	Thermo Scientific	Fisher Cat# C22843
Laminin	Sigma Aldrich	Cat#L2020
Poly-L-Lysine	Sigma Aldrich	Cat#P1399
Collagen I, rat tail	Thermo Scientific	Fisher Cat#A1048301
Experimental models: Cell lines		
Monkey: COS cells	ATCC	Cat# CRL-1651
Mouse: Neuro-2a	ATCC	Cat# CCL-131
Experimental models: Organisms/strains		
Mouse: PTEN ^{fl/fl} /SOCS3 ^{fl/fl}	Sun et al., 2011; The Jackson Laboratory	N/A

Mouse: OPN4-GFP/PTEN ^{fl/fl} /SOCS3 ^{fl/fl}	Schmidt et al., 2008; Sun et al., 2011; The Jackson Laboratory	N/A
Mouse: PTEN ^{fl/fl} /SOCS3 ^{fl/fl} /Robo1 ^{-/-} /Robo2 ^{fl/fl}	Long et al., 2004; Lu et al., 2007; Sun et al., 2011; Dr Alain Chédotal	N/A
Mouse : Slit1 ^{-/-} Slit2 ^{fl/fl}		N/A
Oligonucleotides		
Primer ISH: Plexin-A1 Forward 5'-CCCCACTGTGGCTGGTGTG-3'	This paper	N/A
Primer ISH: Plexin-A1 Reverse 5'-GAAAGGCGCAGTCAGCCGCA-3'	This paper	N/A
Primer ISH: Robo1 Forward 5'-AGCAGTGGATGGCACTTTAA-3'	This paper	N/A
Primer ISH: Robo1 Reverse 5'-GGAAAAGGTAAATGGCGTTA-3'	This paper	N/A
Primer ISH: Robo2 Forward 5'-CTTTTCCCGAATCAACCTCA-3'	This paper	N/A
Primer ISH: Robo2 Reverse 5'-GGGAGGTCATTCATATCATA-3'	This paper	N/A
Primer ISH: Sema6D Forward 5'-TTCCTCCATGTGTGTCCTGT-3'	This paper	N/A
Primer ISH: Sema6D Reverse 5'-GTTGGGTAAATGACTGGGTGATGT-3'	This paper	N/A
Primer ISH: Sfrp1 Forward 5'-GGACCTGAGGCTGTGCCACA-3'	This paper	N/A
Primer ISH: Sfrp1 Reverse 5'-TCTTCTTGGGGACAATCTTC-3'	This paper	N/A
Primer ISH: Sfrp2 Forward 5'-GCCCAACCTGCTGGGCCACG-3'	This paper	N/A
Primer ISH: Sfrp2 Reverse 5'-CGCCGTTTCAGCTTGTAATG-3'	This paper	N/A
Primer ISH: Slit1 Forward 5'-CACTGGGTTGTTTAAAGAAGC-3'	This paper	N/A
Primer ISH: Slit1 Reverse 5'-CCTGGCCTTCCTCACACCTG-3'	This paper	N/A
Primer ISH: Slit2 Forward 5'-CCTGCCAGCATGACTCCAAG-3'	This paper	N/A
Primer ISH: Slit2 Reverse 5'-TCTATAGAGTTCCACGGCAA-3'	This paper	N/A
Primer ISH: VEGF-A Forward 5'-GCAGCGACAAGGCAGACTA-3'	This paper	N/A
Primer ISH: VEGF-A Reverse 5'-GCTAGCACTTCTCCCAGCTC-3'	This paper	N/A
Primer qPCR: Slit1 Forward 5'-AGGTGCAAAAGGGCGAAT-3'	This paper	N/A
Primer qPCR: Slit1 Reverse 5'-CGAGAGGGTACAGGCAGGT-3'	This paper	N/A
Primer qPCR: Slit2 Forward 5'-CGGGGACAGCTGTGATAGAG-3'	This paper	N/A
Primer qPCR: Slit2 Reverse 5'-CCAAGCGAGATACTTTCTTAGTTGT-3'	This paper	N/A
Recombinant DNA		
Plasmid ISH: Ephrin-B1	Dr Valérie Castellani	N/A
Plasmid ISH: Netrin1	Dr Valérie Castellani	N/A
Plasmid ISH: NrCAM	Dr Valérie Castellani	N/A

Plasmid ISH: Shh	Dr Valérie Castellani	N/A
Plasmid ISH: Slit3	Dr Alain Chédotal	N/A
Software and algorithms		
Zen	Zeiss	N/A
Fiji	Image J	N/A
IMARIS v.9.6	Bitplane	N/A
GraphPad Prism 9	GraphPad software	N/A
Fusion	Andor	N/A

Animals

All animal care and procedures were performed in compliance with the Grenoble Institute of Neuroscience-U1216, French and European guidelines. We used PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl}, OPN4-GFP/PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl}, PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl}/Robo1^{-/-}/Robo2^{fl/fl} and Slit1^{-/-}/Slit2^{fl/fl} mice in this study, regardless of their sex and aged at least 3 weeks. To obtain OPN4-GFP/PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl} mice, we crossed OPN4-GFP mice (Schmidt, Taniguchi, et Kofuji 2008) with PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl} (Sun et al. 2011). PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl}/Robo1^{-/-}/Robo2^{fl/fl} come from PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl} and PTEN^{fl/fl}/Robo1^{-/-}/Robo2^{fl/fl} (Long et al. 2004; Lu et al. 2007) crossing mice. Before each surgery, all animals were anesthetized with ketamine (75-100 mg/kg, Clorkétam 1000, Vetoquinol) and xylasine (10 mg/kg, Rompun 2%, BAYER).

Intravitreal virus injection

The eyelid of the eye was pinched with a mini bulldog serrefines clamp (Fine Science Tools) to bring the eye out of its socket and expose the posterior part of the eye. Using a Hamilton syringe (Hamilton) connected to a glass micropipette (Sutter Instruments), the posterior part of the eye located just behind the ora serrata was pierced with the glass micropipette at an angle of 45° to avoid damaging the lens. About 2µl of vitreous humor was aspirated before the injection of 1µL of adeno-associated virus type 2 (AAV2) concentrated with at least 10¹¹ viral particles per ml. Likewise, 2 days before the end of the experiment, animals received an intravitreal injection of 1µl of CTB at 1µg/µL (ThermoFisher Scientific). Mice with eye inflammation, damage or atrophies were excluded from further experiments.

Optic nerve crush

2 weeks after the AAV2 intravitreal injections, optic nerve crush was performed. The connective tissue above the eye was carefully cut using scissors (Fine Science Tools). Forceps (Fine Science Tools) were then placed between the 2 arteries located behind the eyeball and then very delicately the blood vessels were separated to expose the optic nerve. Using second forceps, the optic nerve was pinched for 5 seconds at 1-2 mm behind the eyeball. Animals with excessive bleeding were excluded from further experiments.

Intracranial injections

10 weeks-old Slit1^{-/-}/Slit2^{fl/fl} mice were anesthetized as previously described and installed on a stereotaxic frame. The skin was cut letting the skull visible. Using the canula, the bregma was defined as the origin of the axis. After verifying the flat skull positioning, two holes was performed using a dental burr at A/P: +0.1mm, M/L: +/-0.1mm, D/V: -5.5mm (for SCN injection) and -6mm (for chiasm injection). 1µl of virus (AAV2-Cre for co-culture experiment) or CTB (for retrograde labeling) was injected using a syringe pump (0.5µl/min). After injection, the skin was sutured and animals were sacrificed 2 weeks after.

c-fos experiment

To study SCN neurons activation upon light exposure, we designed 5 mice groups. Group 1 (positive control): WT intact mice with 4h dark exposure, followed by 30min in light and again 30min in darkness (this scheme is called 4-30-30). Group 2 (negative control): WT intact mice kept in the dark. Group 3: WT mice with bilateral optic nerve lesion in 4-30-30 condition. Group 4: PTEN^{-/-} SOCS^{-/-} Robo1^{+/+} Robo2^{+/+} mice in 4-30-30 condition. Group 5: PTEN^{-/-} SOCS^{-/-} Robo1^{+/-} Robo2^{+/-} mice in 4-30-30 condition. Group 6: PTEN^{-/-} SOCS^{-/-} Robo1^{-/-} Robo2^{-/-} in 4-30-30 condition. After each condition, mice were sacrificed and perfused in the dark. Brains were dissected out and cut into 40µm thick-section, and immunofluorescence with anti-c-fos antibody was performed.

Co-culture experiments

Two weeks after Slit1^{-/-}/Slit2^{fl/fl} mice intracranial injection, animals were sacrificed. Fresh brains were cut using a vibratome (300µm thick sections). Then, SCN were microdissected out constituting SCN explants. The glass coverslips used for the co-cultures were previously coated with 0.5mg/ml poly-L-lysine for 1h at 37°C. After washes and air-dry, a thin layer of collagen matrix was applied on each coverslip (500µl of 3mg/ml collagen I (from rat tail, Thermo Scientific), 20µl of 1mg/ml laminin (Sigma-Aldrich), 12.5µl of 1N NaOH, 100µl of PBS 10X (Euromedex) and 367.5µl of Neurobasal-A) and left to polymerise at 37°C for 20 min. In parallel, retina from PSM mice were dissected out and cut into small squares (about 500µm as described in Schaeffer et al., 2020). A retina explant and a SCN explant were laid onto the coated coverslip and a 60µl drop of the collagen mix was applied. Co-cultures were placed at 37°C for few minutes before adding the culture medium: 2%-B27 (ThermoFisher Scientific), 1%-L-Glutamine (Corning), 1%-Penicillin/Streptomycin (ThermoFisher Scientific), Neurobasal-A (ThermoFisher Scientific). Co-cultures were incubated at 37°C with 5% CO₂ for 10 days.

Tissue preparation

28 days post crush (dpc) animals were anesthetized with ketamine (75-100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and then intracardially perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) (Electron Microscopy Sciences). Brains, optic nerves and eyes were dissected and post-fixed in 4% PFA overnight at 4°C. Brains and eyes were dehydrated in 30% sucrose (Sigma-Aldrich) for 2 days at 4°C before embedded in OCT tissue freezing medium (MM-France) and stored at -80°C. Using cryostat (Thermo Scientific), 20µm coronal brain, 14µm eyes and 14µm optic nerve sections were performed. Sections were collected on SuperFrost slides (ThermoFisher Scientific,) and stored at -20°C until further use.

Optic nerve and chiasm clearing

Optic nerves and/or chiasm were clarified as described in (Dodt et al. 2007). Briefly, after post-fixation in 4%-PFA, optic nerves (and/or chiasm) were gradually dehydrated in ethanol baths (50%, 80%, 95%, 100%) for at least 20min each at room temperature. Optic nerves (and/or chiasm) were incubated in 100% ethanol overnight at 4°C. Then, optic nerves (and/or chiasm)

were further dehydrated in hexane (Sigma-Aldrich-Merck) for 2h before were cleared in benzyl alcohol (Sigma-Aldrich-Merck) / benzyl benzoate (Sigma-Aldrich-Merck,) solution (volume 1:2). Optic nerves (and/or chiasm) were stored in this solution at room temperature, sheltered from light.

Whole brain immunostaining and clearing

Tissues were labelled and cleared as described in (Vigouroux et al. 2020). Briefly, after post-fixation in 4%-PFA, the SCN region attached to the two optic nerves was isolated from the whole brain. After two washes in PBS, tissues were progressively dehydrated in methanol (MetOH) (VWR,) baths: 40%-MetOH (diluted in PBS), 80%-MetOH (diluted in distilled H₂O) and 100%-MetOH for at least 2h at room temperature and overnight at 4°C for 100%-MetOH. Tissues were then gradually rehydrated in 80%-MetOH (diluted in distilled H₂O), 40%-MetOH (diluted in PBS) and PBS for at least 2h at room temperature each and then kept at 4°C overnight in PBS. The next day, samples were incubated for all day in blocking solution (5% Donkeyserum-0,5% Triton in PBS) and then incubated with anti-VIP (1/400, Immunostar) antibody diluted in blocking solution for at least 4 nights at 4°C. Tissues were washed at least 6 times during all day (1 hour each) with 0,5%-triton-PBS before being incubated with Alexa-647 conjugated donkey anti-rabbit (1/400, ThermoFisher Scientific) for 2 nights at 4°C. After at least 6 washes of 1h using 0,5%-triton-PBS, samples were kept in PBS overnight at 4°C. Then, tissues were progressively dehydrated in MetOH baths: 20%-MetOH (diluted in PBS), 40%-MetOH (diluted in PBS), 80%-MetOH (diluted in distilled H₂O) and 100%-MetOH for at least 2h at room temperature. Tissues were fully dehydrated in 100%-MetOH/Dichloromethane (Sigma-Aldrich-Merck) (volume 1:2) overnight at 4°C. Samples were then incubated 30min in dichloromethane before clearing in di-benzyl ether (DBE) (Sigma-Aldrich-Merck). Tissues were stored in DBE in the dark at room temperature.

Immunostaining

For retina or brains sections, after three washes of 10 min with 1x PBS, tissues were saturated in a blocking solution (3%-BSA (Sigma-Aldrich), 5%-Donkey Serum (Merck Millipore), 0,5-

%triton (Sigma-Aldrich) in PBS) for 1h at room temperature and then incubated overnight at 4°C with primary antibodies: anti-melanopsin (Abcam, 1:200), anti-GFP (Abcam, 1:500), anti-RBPMS (Merck Millipore, 1:400), anti-VIP (Immunostar, 1:400), anti-Vglut2 (Abcam, 1:500), anti-PSD95 (Abcam, 1:500), anti-c-fos (Cell Signaling Technology, 1:200). The following day, three washes of 10 min with PBS 0,1%-triton were carried out before incubation for 2h at RT with the secondary antibodies diluted all at 1:400: Donkey anti-chicken Alexa 488 (Jackson), Donkey anti-goat Alexa 488 (ThermoFisher Scientific), Donkey anti-rabbit Alexa 488 (ThermoFisher Scientific), Donkey anti-rabbit (ThermoFisher Scientific), Donkey anti-rabbit Alexa 647 (ThermoFisher Scientific), Donkey anti-guinea pig Alexa 647 (Jackson), Donkey anti-mouse Alexa 647 (ThermoFisher Scientific), Donkey anti-mouse Alexa 568 (ThermoFisher Scientific). Sections were washed three times for 10min and then mounted with Fluoromount-G with DAPI mounting medium (ThermoFisher Scientific).

For co-cultures, samples were fixed in 3%-sucrose-8%-PFA, diluted at 1/2 directly in the medium for 15 minutes. Explants were washed three times in PBS and then permeabilized 10min in PBS-0,1%- triton. Primary (anti-Tuj1, Biolegend, 1:400) and secondary antibodies (donkey anti-mouse Alexa 568) were diluted in blocking solution (3%-BSA, 5%-Donkey Serum, 0,1%-triton-PBS) and samples were incubated for 2h and 1h respectively. After PBS washes, samples were mounted with Fluoromount-G with DAPI (Invitrogen).

For in toto retinas, after three washes with PBS, a 0.5% Triton-PBS, 5%-Donkey serum blocking was added for 1h. Primary antibody anti-melanopsin (Abcam, 1:300) and secondary donkey anti-rabbit Alexa 488 (ThermoFisher Scientific, 1:300) were incubated for respectively one night and 2h. After 0.1%-triton PBS washes, retinas were whole-mounted with Fluoromount-G with DAPI (ThermoFisher Scientific).

For growth cone immunostaining on explant culture, samples were fixed in 3%-sucrose-8%-PFA, diluted at 1/2 directly in the medium for 15 minutes. After three washes with PBS, they were incubated overnight in 3%-BSA PBS with primary antibody: anti-Robo1 (, 1:200) or anti-

Robo2 (, 1:200) and anti-Tuj1 (, 1:800). After three washes with PBS, secondary antibodies (donkey anti-mouse Alexa 568, 1:1000; donkey anti-rabbit Alexa 488, 1:400 and phalloidin Alexa 647, 1:500) for 2h. After PBS washes, explants were mounted with Fluoromount G with DAPI (ThermoFisher Scientific).

In Situ Hybridization

For colorimetric in situ hybridization (ISH), slices were incubated with digoxigenin (DIG)-labeled probes for Ephrin-B1, Netrin1, NrCAM, Plexin-A1, Robo1, Robo2, Sema-6D, Sfrp1, Sfrp2, Shh, Slit1, Slit2, Slit3 or VEGF overnight at 65°C.

For fluorescent ISH, samples were incubated with digoxigenin-labeling probes for Robo1 or Robo2. The DIG-labeling probes were amplified using Cy3,5 tyramide signal amplification kit (PerkinElmer) for 10 min.

Quantitative RT-PCR

Both optic nerves from wild-type (PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl} background) 6 week-old mice were crushed. One month later, suprachiasmatic nuclei (SCN) were dissected from crushed and uncrushed (intact) mice. SCN were dissociated in Trizol (Ambion Life technologies) for the total RNA extraction. 100ng of total RNA were used for the reverse transcription using SuperScript II (Invitrogen). mRNA level was assessed by qPCR (Biorad) for Slit1, Slit2, and Slit3.

Imaging

DragonFly spinning disk confocal from Andor was used for imaging immunofluorescence and fluorescence in situ hybridization (ISH) with a 25x objective and clarified brains, optic nerves and chiasm with a 20x objective. Images were acquired with a 2µm thick planes and were automatically stitched using microscope's Fusion software. All planes were compiled in 2D-maximum intensity projection. Colorimetric ISH were imaged using Zeiss Slide Scanner Axio Scan.Z1 and co-cultures with epifluorescence microscope Nikon Ti Eclipse with 4x objective. Vglut2/PSD95 immunofluorescence were imaged using a confocal microscope with an AiryScan mode.

Guidance defect quantification

Whole-mount of both optic nerves attached to the optic chiasm and SCN cleared were imaged using DragonFly spinning disk confocal (Andor) with 20x objective. By using Fusion software (Andor), we acquired all tissues with Z stack (2 μ m-thick planes) and tiling (20% overlap). All quantifications were assessed using Imaris software (version 9.6, Bitplane). For the percentage of regenerating axons into the contralateral optic nerve, we performed an XZ orthogonal section at the distal end of optic nerves using the ortho slicer tool and we counted each CTB-dot as one axon. We divided the number of axons at the distal end of the contralateral optic nerve by the axons number counted at the distal end of the ipsilateral optic nerve (ION). For the proportion of regenerating axons in others regions, we proceeded in the same way, using the oblique (YZ oblique section at the midline for the chiasm) or ortho (XZ orthogonal section at the proximal part of the optic tracts) slicers tools and divided the number of axons counted by the axons number found at the distal end of the ION. The proportion of regenerating axons into the SCN was calculated using YX orthogonal slicer tool. We counted the number of CTB fibers into the whole SCN along the entire Z plane and divided this value by the axons number present at the distal end of the ION.

Melanopsin positive neurons survival quantification

Eyes from intact, 3 days post-crush (dpc), 14dpc and 28dpc of PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl} mice injected with AAV2-Cre + AAV2-CNTF + AAV2-c-myc (PSM) were collected and post-fixed in PFA-4% solution overnight at 4°C after the intra-cardiac perfusion of the mice. Tissue were prepared and stained with anti-melanopsin and anti-RBPMS antibodies as described above. Using Zeiss Slide Scanner Axio Scan.Z1, retina slices were imaged with 20x objective. Melanopsin⁺ cells were counted on 5 retinas 14 μ m slices for each animal and sum up. By using anti-RBPMS staining, we assessed the retina length of all 5 retina slices. The sum of melanopsin⁺ cells number for each animal has been reported by cm. For each condition, the melanopsin⁺ cells survival was calculated by dividing the average melanopsin⁺ cells number of each animal by the average of intact PSM condition.

ipRGC (GFP+) axon regeneration quantification

Optic nerve sections from intact OPN4-GFP/PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl} 10 weeks old mice and 28dpc OPN4-GFP/PTEN^{fl/fl}/SOCS3^{fl/fl} mice injected with AAV2-Cre + AAV2-CNTF + AAV2-c-myc were stained with anti-GFP and anti-CTB antibodies as described above. Optic nerve sections were imaged using DragonFly spinning disk confocal (Andor) with 25x objective and Fusion software. Each optic nerve section was acquired with Z stack (2 μ m-thick planes) and tiling (20% overlap). The maximum intensity projection was performed with Image J software. The number of GFP+ axons was counted at different distances from the injury site (defined thank to CTB-labeled axons) for at least 5 sections per animal. For all distances from the injury site, the percentage of GFP+ axon regenerating was calculated by dividing the average of GFP+ axon number per section for each animal by the average of GFP+ axons number per section of intact condition.

Co-culture data analysis

For each co-culture, the retina and the SCN explants were manually annotated using ImageJ and the proximal and distal regions were defined as the 90°-angle portion of retina explant towards and away from the SCN explant, respectively. Axon outgrowth was quantified in each region with a Sholl analysis using the ImageJ plug-in Neurite-J (Torres-Espín et al. 2014). Background noise filtering was performed automatically and manually corrected. The number of neurite intersects was determined by the Sholl analysis with a step of 25 μ m. The guidance index is calculated as the log₂-transform of the maximal length of axons in the proximal versus the distal regions. With this index, a positive value represents attraction towards the source (SCN explant), while a negative value represents repulsion away from the source, and a zero-value represents no preference. For statistical analysis, data were subjected to a one-sample t-test with a theoretical value of 0, using GraphPad Prism version 9.1.2.

Statistical analysis

All statistical analysis were performed using GraphPrism software version 8. The normal distribution of each dataset was assessed with Shapiro-Wilk test. The Student's t-test for two

conditions or the ANOVA test for at least three conditions were realized when the dataset was distributed normally. In the case where the dataset was not distributed normally, the Mann-Whitney test for two conditions or the Kruskal-Wallis test for multiple conditions were used. The difference between two averages were considered significant when the p -value $<0,05$. The asterisk * was used when the p -value <0.05 ; ** when p -value <0.01 ; *** for p -value <0.001 and NS indicates not significant ($p>0.05$).

Authors contributions

Conceptualization HN. Methodology HN. Experiments were performed by CD, JS and NV. Supervision SB and HN. Original draft and editing HN SB AC JS and CD. Imaging 3D reconstruction AB. Mice colony handling and technical assistance EP. qPCR experiments FA. Technical assistance AP. Virus production, handling and imaging BE. Funding acquisition HN. Resources, scientific input and advices AC, VC and YZ.

Figure legends

Figure 1: Regenerating axons fail to reform the visual circuit. (A) Timeline of experimental model of long-distance regeneration in the mouse visual system. (B) Confocal picture of whole optic nerves and optic chiasm 28 days post unilateral optic nerve crush (28dpc) in a $PTEN^{fl/fl}$ $SOCS3^{fl/fl}$ mouse eye injected with AAV2-Cre + AAV2-CNTF + AAV2-c-myc. Regenerating axons are traced using CTB (white). The red dashed line indicates the lesion site. Scheme of guidance defects observed in unilateral optic nerve crush: some axons turn back to the ipsilateral eye, others project to the contralateral optic nerve or get lost in the optic chiasm. (C) 3D picture of whole optic nerves and optic chiasm 28dpc in bilateral optic nerve crush. Regenerating axons are traced with CTB (cyan). The SCN is labeled with anti-VIP (magenta). Scheme and quantification of guidance defects observed in bilateral optic nerve crush: regenerating axons fail to resume the ipsi- versus contralateral distribution of the intact circuit.

(D) Scheme of bilateral optic nerve crush. Confocal picture showing regenerating axons traced with CTB (cyan) and the SCN labeled with anti-VIP (magenta). Regenerating axons fail to enter the SCN.

Figure 2: The SCN exerts a Slit-dependent repulsive activity. (A) In situ hybridization showing Slit1, 2 and 3 expression in the SCN of PTEN^{fl/fl} SOCS3^{fl/fl} mice, where one eye was injected with AAV2-Cre + AAV2-CNTF + AAV2-c-myc. Expression is maintained at 28dpc. (B) Principle of stereotaxic injection of AAV2-Cre in the SCN. Control of injection in the SCN of Rosa26-stop^{fl/fl}-Tdtomato mice showing Tdtomato expression (magenta) in the SCN labeled with anti-VIP (green). (C) The WT SCN exerts a repulsive activity on axons growing from a retina explant, whereas depletion of Slit1, Slit2 or both or Slit3^{-/-} from the SCN abolishes its repulsive activity on growing axons ex vivo. Representative pictures of a WT, Slit1^{-/-}, Slit2^{-/-}, Slit3^{-/-} or Slit1^{-/-} Slit2^{-/-} SCN, co-cultured with an explant from a PTEN^{fl/fl} SOCS3^{fl/fl} retina injected with AAV2-Cre + AAV2-CNTF + AAV2-c-myc. (C) Corresponding quantification of guidance index showing the log-ratio of axon growth in the proximal versus the distal area. A negative guidance index indicates a significantly repulsive activity, while a null guidance index indicates a neutral activity. Data are expressed as mean +/- s.e.m. One-sample t-test compared to zero, * p = 0.0219, ns: not significant.

Figure 3: Modulation of Robo /Slit signaling in vivo promotes entry of regenerating axons into the SCN. (A) Confocal picture of whole optic nerves and optic chiasm 28 days post unilateral optic nerve crush (28dpc) in PTEN^{fl/fl} SOCS3^{fl/fl} (left, Robo1^{+/+} Robo2^{+/+}), PTEN^{fl/fl} SOCS3^{fl/fl} Robo1^{+/-} Robo2^{+/fl} (centre, Robo1^{+/-} Robo2^{+/-}) and PTEN^{fl/fl} SOCS3^{fl/fl} Robo1^{-/-} Robo2^{fl/fl} (right, Robo1^{-/-} Robo2^{-/-}). One eye was injected with AAV2-Cre + AAV2-CNTF + AAV2-c-myc. Regenerating axons are traced using CTB (white). Pictures are representative of N=3-6 animals in each condition. Zoom pictures: the SCN is indicated with the yellow dashed

line on the maximum projection panel and on the XZ orthogonal section panel. In Robo1/2-double-knockout condition (Robo1^{-/-} Robo2^{-/-}) – and to a lesser extent in heterozygous Robo1/2-double-knockout (Robo1^{+/-} Robo2^{+/-}) – many regenerating axons enter the SCN. (B) Left: quantification of the number of axons entering the SCN. Data are expressed as mean +/- s.e.m. One-way ANOVA with Dunnett's correction, *** p-value = 0.0005, ns: p-value = 0.6335, not significant. Right: distribution of axons entering the ipsilateral and the contralateral SCN. Data are expressed as mean +/- s.e.m. (C) Confocal picture of the ipsilateral SCN from a PTEN^{fl/fl} SOCS3^{fl/fl} Robo1^{-/-} Robo2^{fl/fl} OPN4-GFP mouse injected with AAV2-Cre + AAV2-CNTF + AAV2-c-myc with bilateral optic nerve crush at 28dpc. Arrowheads point to GFP+ CTB+ fibers in the SCN, indicating that OPN4-GFP+ ipRGC enter the SCN in Robo-knockout condition at 28dpc.

Figure 4: Guidance of regenerating axons into the SCN results in its reactivation. (A) Regenerative fibers form synapses in the SCN. Left: confocal picture of the ipsilateral SCN from a PTEN^{fl/fl} SOCS3^{fl/fl} Robo1^{-/-} Robo2^{fl/fl} mouse injected with AAV2-Cre + AAV2-CNTF + AAV2-c-myc with bilateral optic nerve crush at 28dpc. Right: 3D confocal picture with Airyscan technology of an individual regenerative fiber forming a synapse in the SCN. The pre-synaptic compartment marker VGLUT2 (cyan) colocalizes with the CTB+ fiber (yellow) and is adjacent to the post-synaptic compartment marker PSD95 (magenta). (B) Zoom of (A) showing the synapse formed by the CTB+ regenerative fiber. Profile of intensity in a single z plan along the white arrow. (C) Principle of c-fos activation experiment. (D) Confocal pictures showing SCN expression of c-fos (magenta) in the 28dpc regeneration model, in Robo1/2^{+/+}, Robo1/2^{+/-} and Robo1/2^{-/-} conditions. CTB (green) was used to trace regenerating axons. The SCN is indicated with a white dashed line. Each picture is representative of N=5 mice. (E) Corresponding quantification of anti-c-fos labeling fluorescence intensity versus the number of c-fos+ cells per mm² section in the SCN. (F) Corresponding quantification of the number of c-fos+ cells per

mm² section in the SCN. Data are expressed as mean +/- s.e.m. One-way ANOVA with multiple comparisons, * p-value = 0.018, ** p-value = 0.0026.

Figure S1: Regenerating axons display guidance defects in the adult visual system. (A)

3D picture of whole optic nerves and optic chiasm 28dpc in unilateral optic nerve crush. Regenerating axons are traced with CTB-555 (cyan). Intact (contralateral) axons are traced with CTB-647 (magenta). Scheme and quantification of guidance defects observed in unilateral optic nerve crush: regenerating axons fail to resume the ipsi- versus contralateral distribution of the intact circuit. (B) Quantification of the percentage of regenerative fibers intersecting the midline (distance 0) and projecting ipsilaterally or contralaterally in the optic chiasm. Comparison of unilateral and bilateral optic nerve crush. Unpaired t-tests, * p-value < 0.05, ns: not significant. (C) Representative confocal pictures of XZ orthogonal sections in the ipsi- and contralateral optic nerves. Quantification of the percentage of regenerative fibers projecting to the contralateral optic nerve. Comparison of unilateral and bilateral optic nerve crush. Data are expressed as mean +/- s.e.m. Unpaired t-test, * p-value < 0.05. (D) Representative confocal pictures of XZ orthogonal sections in the ipsi- and contralateral optic tracts. Quantification of the percentage of regenerative fibers projecting to the contralateral and ipsilateral optic tracts. Comparison of unilateral and bilateral optic nerve crush. Data are expressed as mean +/- s.e.m. Unpaired t-test, * p-value < 0.05, ns: not significant. (E) Distribution of axons projecting ipsi- or contralaterally, entering into the tract and dorsal to it. Comparison of unilateral and bilateral optic nerve crush. Data are expressed as mean +/- s.e.m. Unpaired t-test on axons projecting into the tract, * p-value < 0.05, ns: not significant. (F) Scheme of unilateral optic nerve crush. Confocal picture showing regenerating axons traced with CTB-555 (cyan) and intact axons traced with CTB-647 (magenta). Regenerating axons fail to enter the SCN. (G) Left: quantification of the percentage of regenerative fibers entering the SCN. Comparison of unilateral and bilateral optic nerve crush. Data are expressed as mean +/- s.e.m. Unpaired t-test, ns: not significant. Right: distribution of axons entering the ipsi- versus contralateral SCN.

Comparison of unilateral and bilateral optic nerve crush. Data are expressed as mean +/- s.e.m. Unpaired t-test on axons projecting in the ipsilateral SCN, ns: not significant.

Figure S2: ipRGC survive and regenerate in the long-distance regeneration model. (A) Representative confocal pictures of retina sections from PTEN^{fl/fl} SOCS3^{fl/fl} eyes injected with AAV2-Cre + AAV2-CNTF + AAV2-c-myc in intact condition and at 3, 14 and 28dpc. ipRGC are labeled with anti-melanopsin (green) and RGC are labeled with anti-RBPMS (magenta). Corresponding quantification of the number of melanopsin+ cells and melanopsin^{high} cells, in percentage of total ipRGC in intact condition. Data are expressed as mean +/- s.e.m. Kruskal-Wallis test, ns: not significant. (B) Representative confocal picture of optic nerve section from a PTEN^{fl/fl} SOCS3^{fl/fl} OPN4-GFP mouse injected with AAV2-Cre + AAV2-CNTF + AAV2-c-myc at 28dpc. ipRGC axons are GFP+ (green). Regenerating axons are traced with CTB (magenta). The red dashed line indicates the lesion site. Arrowheads point to GFP+ regenerating axons distal to the lesion site. (C) Principle of stereotaxic injection of CTB in the optic chiasm for backtracing of regenerating axons. Representative confocal pictures of whole-mount retinas labeled with anti-CTB (magenta) and anti-melanopsin (cyan).

Figure S3: The SCN expresses Slit and the RGC express their corresponding receptors Robo. (A) In situ hybridization showing guidance cues expression in the SCN of WT mice, in intact condition and at 28dpc. (B) Quantitative PCR on reverse transcription from WT SCN RNA, in intact condition and at 28dpc. Expression levels of Slit1, Slit2 and Slit3 normalized to Gapdh, relative to intact. Data are expressed as mean +/- s.e.m. N=3-5 mice in each condition. Unpaired t-test, ns: not significant. (C) In situ hybridization showing Robo1 and 2 expression in RGC of WT mice, in intact condition and at 3dpc; and in RGC of PTEN^{fl/fl} SOCS3^{fl/fl} mice injected with AAV2-Cre + AAV2-CNTF + AAV2-c-myc, in intact condition, at 3dpc and at 28dpc. (D) Representative confocal pictures showing Robo1 and 2 expression (in situ hybridization

with TSA amplification, magenta) in ipRGC (labeled with anti-melanopsin, green). (E) Representative confocal pictures with Airyscan technology of individual growth cones in an explant culture of a $PTEN^{fl/fl}$ $SOCS3^{fl/fl}$ retina injected with AAV2-Cre + AAV2-CNTF + AAV2-c-myc. Robo1 and 2 (green) are expressed on growth cones, labeled with anti- β -tubulin III (TUJ1, cyan) and phalloidin (magenta).

Figure S4: Single modulation of Robo1 or Robo2 in PSRR regenerating model is less efficient than Robo1 and Robo2 deletion. (A) Confocal picture of whole optic nerves and optic chiasm 28 days post unilateral optic nerve crush (28dpc) in $PTEN^{fl/fl}$ $SOCS3^{fl/fl}$ $Robo1^{+/-}$, $PTEN^{fl/fl}$ $SOCS3^{fl/fl}$ $Robo1^{-/-}$, $PTEN^{fl/fl}$ $SOCS3^{fl/fl}$ $Robo2^{+/-}$ and $PTEN^{fl/fl}$ $SOCS3^{fl/fl}$ $Robo2^{-/-}$. One eye was injected with AAV2-Cre + AAV2-CNTF + AAV2-c-myc. Regenerating axons are traced using CTB (white). Pictures are representative of N=3-5 animals in each condition. Zoom pictures: the SCN is indicated with the yellow dashed line on the maximum projection panel and on the XZ orthogonal section panel. (B) Left: quantification of the number of axons entering the SCN. Data are expressed as mean +/- s.e.m. One-way ANOVA with Dunnett's correction, *** p-value = 0.0005, ns: p-value = 0.6335, not significant. Right: distribution of axons entering the ipsilateral and the contralateral SCN. Data are expressed as mean +/- s.e.m.

Figure S5: Light exposure triggers c-fos expression in the SCN. (A) Confocal pictures showing SCN expression of c-fos (magenta) in intact condition, where mice were subjected to light or left in the dark, and in control condition at 28dpc. The SCN is indicated with a white dashed line. Each picture is representative of N=3-5 mice. (B) Corresponding quantification of the number of c-fos+ cells per mm^2 section in the SCN. Data are expressed as mean +/- s.e.m. One-way ANOVA with multiple comparisons, **** p-value < 0.0001.

Acknowledgements

We warmly thank Dr Alexandra Rebsam (Institut de la Vision, Paris, France) and Dr Julien Falk (INMG, Lyon, France) for their comments and feedbacks during Celine Delpech thesis committee meetings. We warmly thank Dr Xavier Nicol (Institut de la Vision, Paris, France) and Dr Julien Courchet (INMG, Lyon, France) and Dr Mireille Albrieux (Grenoble Institute Neuroscience, France) for their comments and feedbacks during Noemie Vilallongue thesis committee meetings. We would like also thank Charlotte Corrao for Slit1 ISH plasmid cloning.

Funding

This work was supported by a grant from ANR (C7H-ANR16C49), from European Research Council (ERC-St17-759089) and NRJ foundation to HN. This work was supported by grants from the French National Research Agency in the framework of the “investissements d’Avenir” program (ANR-15-IDEX-02 NeuroCoG (HN, SB and CD)). JS is supported by Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) postdoctoral fellowship (SPF201909009106). CD is supported by Fondation de France Bourse Berthe Fouassier. NV is supported by Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) thesis fellowship (FDT202204014716).

Ethics approval and consent to participate

All animal care and procedures have been approved by the Ethics Committee of the Grenoble Institute of Neuroscience (project number 201612161701775) and by the French Ministry of Research (project number APAFIS#9145- 201612161701775v3) in accordance with French and European guidelines.

Competing interests

The authors declare that no competing interests exist.

References

- Bedont, J.L., and Blackshaw, S. (2015). Constructing the suprachiasmatic nucleus: a watchmaker's perspective on the central clockworks. *Frontiers in Systems Neuroscience* 9.
- Belin, S., Nawabi, H., Wang, C., Tang, S., Latremoliere, A., Warren, P., Schorle, H., Uncu, C., Woolf, C.J., He, Z., et al. (2015). Injury-Induced Decline of Intrinsic Regenerative Ability Revealed by Quantitative Proteomics. *Neuron* 86, 1000–1014.
- Bray, E.R., Yungheer, B.J., Levay, K., Ribeiro, M., Dvoryanchikov, G., Ayupe, A.C., Thakor, K., Marks, V., Randolph, M., Danzi, M.C., et al. (2019). Thrombospondin-1 Mediates Axon Regeneration in Retinal Ganglion Cells. *Neuron*.
- Brose, K., Bland, K.S., Wang, K.H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., and Kidd, T. (1999). Slit Proteins Bind Robo Receptors and Have an Evolutionarily Conserved Role in Repulsive Axon Guidance. *Cell* 96, 795–806.
- Carmichael, S.T., Archibeque, I., Luke, L., Nolan, T., Momiy, J., and Li, S. (2005). Growth-associated gene expression after stroke: evidence for a growth-promoting region in peri-infarct cortex. *Experimental Neurology* 193, 291–311.
- Chaudhry, N., and Filbin, M.T. (2007). Myelin—Associated Inhibitory Signaling and Strategies to Overcome Inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 1096–1107.
- Chen, S.-K., Badea, T.C., and Hattar, S. (2011). Photoentrainment and pupillary light reflex are mediated by distinct populations of ipRGCs. *Nature* 476, 92–95.
- Colello, R.J., and Guillery, R.W. (1990). The early development of retinal ganglion cells with uncrossed axons in the mouse: retinal position and axonal course. *Development* 108, 515–523.
- Crair, M.C., and Mason, C.A. (2016). Reconnecting Eye to Brain. *The Journal of Neuroscience* 36, 10707–10722.
- Dickson, B.J. (2002). *Molecular Mechanisms of Axon Guidance*. 298, 8.
- Dodt, H.-U., Leischner, U., Schierloh, A., Jährling, N., Mauch, C.P., Deininger, K., Deussing, J.M., Eder, M., Zieglgänsberger, W., and Becker, K. (2007). Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods* 4, 331–336.
- Dräger, U.C. (1985). Birth dates of retinal ganglion cells giving rise to the crossed and uncrossed optic projections in the mouse. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 224, 57–77.
- Duan, X., Qiao, M., Bei, F., Kim, I.-J., He, Z., and Sanes, J.R. (2015). Subtype-Specific Regeneration of Retinal Ganglion Cells following Axotomy: Effects of Osteopontin and mTOR Signaling. *Neuron* 85, 1244–1256.
- Ellezam, B., Selles-Navarro, I., Manitt, C., Kennedy, T.E., and McKerracher, L. (2001). Expression of Netrin-1 and Its Receptors DCC and UNC-5H2 after Axotomy and during Regeneration of Adult Rat Retinal Ganglion Cells. *Experimental Neurology* 168, 105–115.
- Fawcett, J. (2009). Molecular control of brain plasticity and repair. In *Progress in Brain Research*, (Elsevier), pp. 501–509.

- Fernandez, D.C., Chang, Y.-T., Hattar, S., and Chen, S.-K. (2016). Architecture of retinal projections to the central circadian pacemaker. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 6047–6052.
- Fouquet, C., Di Meglio, T., Ma, L., Kawasaki, T., Long, H., Hirata, T., Tessier-Lavigne, M., Chedotal, A., and Nguyen-Ba-Charvet, K.T. (2007). Robo1 and Robo2 Control the Development of the Lateral Olfactory Tract. *Journal of Neuroscience* 27, 3037–3045.
- Franze, K., Janmey, P.A., and Guck, J. (2013). Mechanics in Neuronal Development and Repair. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 15, 227–251.
- Glasgow, S.D., Ruthazer, E.S., and Kennedy, T.E. (2021). Guiding synaptic plasticity: Novel roles for netrin-1 in synaptic plasticity and memory formation in the adult brain. *J Physiol* 599, 493–505.
- Guillery, R., Mason, C., and Taylor, J. (1995). Developmental determinants at the mammalian optic chiasm. *J. Neurosci.* 15, 4727–4737.
- Kidd, T., Bland, K.S., and Goodman, C.S. (1999). Slit Is the Midline Repellent for the Robo Receptor in Drosophila. *Cell* 96, 785–794.
- Lee, J.K., Geoffroy, C.G., Chan, A.F., Tolentino, K.E., Crawford, M.J., Leal, M.A., Kang, B., and Zheng, B. (2010). Assessing Spinal Axon Regeneration and Sprouting in Nogo-, MAG-, and OMgp-Deficient Mice. *Neuron* 66, 663–670.
- Li, S., Yang, C., Zhang, L., Gao, X., Wang, X., Liu, W., Wang, Y., Jiang, S., Wong, Y.H., Zhang, Y., et al. (2016). Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the melanopsin/GPCR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 1937–1942.
- Liebl, D.J., Morris, C.J., Henkemeyer, M., and Parada, L.F. (2003). mRNA expression of ephrins and Eph receptor tyrosine kinases in the neonatal and adult mouse central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 71, 7–22.
- Lim, J.-H.A., Stafford, B.K., Nguyen, P.L., Lien, B.V., Wang, C., Zukor, K., He, Z., and Huberman, A.D. (2016). Neural activity promotes long-distance, target-specific regeneration of adult retinal axons. *Nature Neuroscience* 19, 1073–1084.
- de Lima, S., Koriyama, Y., Kurimoto, T., Oliveira, J.T., Yin, Y., Li, Y., Gilbert, H.-Y., Fagiolini, M., Martinez, A.M.B., and Benowitz, L. (2012). Full-length axon regeneration in the adult mouse optic nerve and partial recovery of simple visual behaviors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 9149–9154.
- Lindborg, J.A., Tran, N.M., Chenette, D.M., DeLuca, K., Foli, Y., Kannan, R., Sekine, Y., Wang, X., Wollan, M., Kim, I.-J., et al. (2021). Optic nerve regeneration screen identifies multiple genes restricting adult neural repair. *Cell Reports* 34, 108777.
- Long, H., Sabatier, C., Le Ma, Plump, A., Yuan, W., Ornitz, D.M., Tamada, A., Murakami, F., Goodman, C.S., and Tessier-Lavigne, M. (2004). Conserved Roles for Slit and Robo Proteins in Midline Commissural Axon Guidance. *Neuron* 42, 213–223.
- Lu, W., van Eerde, A.M., Fan, X., Quintero-Rivera, F., Kulkarni, S., Ferguson, H., Kim, H.-G., Fan, Y., Xi, Q., Li, Q., et al. (2007). Disruption of ROBO2 Is Associated with Urinary Tract Anomalies and Confers Risk of Vesicoureteral Reflux. *The American Journal of Human Genetics* 80, 616–632.

- Luo, X., Salgueiro, Y., Beckerman, S.R., Lemmon, V.P., Tsoulfas, P., and Park, K.K. (2013). Three-dimensional evaluation of retinal ganglion cell axon regeneration and pathfinding in whole mouse tissue after injury. *Experimental Neurology* 247, 653–662.
- Marcus, R., and Mason, C. (1995). The first retinal axon growth in the mouse optic chiasm: axon patterning and the cellular environment. *J. Neurosci.* 15, 6389–6402.
- Marillat, V., Cases, O., Nguyenf-Ba-Charvet, K.T., Tessier-Lavigne, M., Sotelo, C., and Chédotal, A. (2002). Spatiotemporal expression patterns of *slit* and *robo* genes in the rat brain: Slit and Robo Expression in the Rat Brain. *J. Comp. Neurol.* 442, 130–155.
- Mason, C., and Slavi, N. (2020). Retinal Ganglion Cell Axon Wiring Establishing the Binocular Circuit. *Annu. Rev. Vis. Sci.* 6, 215–236.
- Monje, M. (2018). Myelin Plasticity and Nervous System Function. *Annu. Rev. Neurosci.* 41, 61–76.
- Mueller, B.K., Yamashita, T., Schaffar, G., and Mueller, R. (2006). The role of repulsive guidance molecules in the embryonic and adult vertebrate central nervous system. *Phil. Trans. R. Soc. B* 361, 1513–1529.
- Nadal-Nicolás, F.M., Madeira, M.H., Salinas-Navarro, M., Jiménez-López, M., Galindo-Romero, C., Ortín-Martínez, A., Santiago, A.R., Vidal-Sanz, M., and Agudo-Barriuso, M. (2015). Transient Downregulation of Melanopsin Expression After Retrograde Tracing or Optic Nerve Injury in Adult Rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56, 4309–4323.
- Nawabi, H., and Castellani, V. (2011). Axonal commissures in the central nervous system: how to cross the midline? *Cellular and Molecular Life Sciences* 68, 2539–2553.
- Nawabi, H., Belin, S., Cartoni, R., Williams, P.R., Wang, C., Latremolière, A., Wang, X., Zhu, J., Taub, D.G., Fu, X., et al. (2015). Doublecortin-Like Kinases Promote Neuronal Survival and Induce Growth Cone Reformation via Distinct Mechanisms. *Neuron* 88, 704–719.
- Norsworthy, M.W., Bei, F., Kawaguchi, R., Wang, Q., Tran, N.M., Li, Y., Brommer, B., Zhang, Y., Wang, C., Sanes, J.R., et al. (2017). Sox11 Expression Promotes Regeneration of Some Retinal Ganglion Cell Types but Kills Others. *Neuron* 94, 1112-1120.e4.
- Park, K.K., Liu, K., Hu, Y., Smith, P.D., Wang, C., Cai, B., Xu, B., Connolly, L., Kramvis, I., Sahin, M., et al. (2008). Promoting Axon Regeneration in the Adult CNS by Modulation of the PTEN/mTOR Pathway. *Science* 322, 963–966.
- Pernet, V., and Schwab, M.E. (2014). Lost in the jungle: new hurdles for optic nerve axon regeneration. *Trends in Neurosciences* 37, 381–387.
- Pernet, V., Joly, S., Dalkara, D., Jordi, N., Schwarz, O., Christ, F., Schaffer, D.V., Flannery, J.G., and Schwab, M.E. (2013a). Long-distance axonal regeneration induced by CNTF gene transfer is impaired by axonal misguidance in the injured adult optic nerve. *Neurobiology of Disease* 51, 202–213.
- Pernet, V., Joly, S., Jordi, N., Dalkara, D., Guzik-Kornacka, A., Flannery, J.G., and Schwab, M.E. (2013b). Misguidance and modulation of axonal regeneration by Stat3 and Rho/ROCK signaling in the transparent optic nerve. *Cell Death Dis* 4, e734–e734.
- Plachez, C., Andrews, W., Liapi, A., Knoell, B., Drescher, U., Mankoo, B., Zhe, L., Mambetisaeva, E., Annan, A., and Bannister, L. (2008). Robos are required for the correct targeting of retinal ganglion cell axons in the visual pathway of the brain. *Molecular and Cellular Neuroscience* 37, 719–730.

- Plump, A.S., Erskine, L., Sabatier, C., Brose, K., Epstein, C.J., Goodman, C.S., Mason, C.A., and Tessier-Lavigne, M. (2002). Slit1 and Slit2 Cooperate to Prevent Premature Midline Crossing of Retinal Axons in the Mouse Visual System. *Neuron* 33, 219–232.
- Rama, N., Dubrac, A., Mathivet, T., Ní Chárthaigh, R.-A., Genet, G., Cristofaro, B., Pibouin-Fragner, L., Ma, L., Eichmann, A., and Chédotal, A. (2015). Slit2 signaling through Robo1 and Robo2 is required for retinal neovascularization. *Nat Med* 21, 483–491.
- Roig-Puiggros, S., Vigouroux, R.J., Beckman, D., Bocai, N.I., Chiou, B., Davimes, J., Gomez, G., Grassi, S., Hoque, A., Karikari, T.K., et al. (2020). Construction and reconstruction of brain circuits: normal and pathological axon guidance. *J. Neurochem.* 153, 10–32.
- Schaeffer, J., Delpech, C., Albert, F., Belin, S., and Nawabi, H. (2020). Adult Mouse Retina Explants: From ex vivo to in vivo Model of Central Nervous System Injuries. *Front. Mol. Neurosci.* 13, 599948.
- Schmidt, T.M., Taniguchi, K., and Kofuji, P. (2008). Intrinsic and Extrinsic Light Responses in Melanopsin-Expressing Ganglion Cells During Mouse Development. *Journal of Neurophysiology* 100, 371–384.
- Seabrook, T.A., Burbridge, T.J., Crair, M.C., and Huberman, A.D. (2017). Architecture, Function, and Assembly of the Mouse Visual System. *Annual Review of Neuroscience* 40, 499–538.
- Silver, J., Schwab, M.E., and Popovich, P.G. (2015). Central Nervous System Regenerative Failure: Role of Oligodendrocytes, Astrocytes, and Microglia. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a020602.
- Smith, P.D., Sun, F., Park, K.K., Cai, B., Wang, C., Kuwako, K., Martinez-Carrasco, I., Connolly, L., and He, Z. (2009). SOCS3 Deletion Promotes Optic Nerve Regeneration In Vivo. *Neuron* 64, 617–623.
- Stoeckli, E.T. (2018). Understanding axon guidance: are we nearly there yet? *Development* 145, dev151415.
- Sun, F., Park, K.K., Belin, S., Wang, D., Lu, T., Chen, G., Zhang, K., Yeung, C., Feng, G., Yankner, B.A., et al. (2011). Sustained axon regeneration induced by co-deletion of PTEN and SOCS3. *Nature* 480, 372–375.
- Torres-Espín, A., Santos, D., González-Pérez, F., del Valle, J., and Navarro, X. (2014). Neurite-J: An Image-J plug-in for axonal growth analysis in organotypic cultures. *Journal of Neuroscience Methods* 236, 26–39.
- Tran, N.M., Shekhar, K., Whitney, I.E., Jacobi, A., Benhar, I., Hong, G., Yan, W., Adiconis, X., Arnold, M.E., Lee, J.M., et al. (2019). Single-Cell Profiles of Retinal Ganglion Cells Differing in Resilience to Injury Reveal Neuroprotective Genes. *Neuron* 104, 1039-1055.e12.
- Ueno, M., Nakamura, Y., Nakagawa, H., Niehaus, J.K., Maezawa, M., Gu, Z., Kumanogoh, A., Takebayashi, H., Lu, Q.R., Takada, M., et al. (2020). Olig2-Induced Semaphorin Expression Drives Corticospinal Axon Retraction After Spinal Cord Injury. *Cerebral Cortex* 30, 5702–5716.
- Vigouroux, R.J., Cesar, Q., Chédotal, A., and Nguyen-Ba-Charvet, K.T. (2020). Revisiting the role of Dcc in visual system development with a novel eye clearing method. *ELife* 9, e51275.

Vilallongue, N., Schaeffer, J., Hesse, A.M., Delpech, C., Paccard, A., Couté, Y., Belin, S., and Nawabi, H. (2021). Axon guidance modalities in CNS regeneration revealed by quantitative proteomic analysis (Neuroscience).

Wang, X.-W., Yang, S.-G., Zhang, C., Hu, M.-W., Qian, J., Ma, J.-J., Zhang, Y., Yang, B.-B., Weng, Y.-L., Ming, G.-L., et al. (2020). Knocking Out Non-muscle Myosin II in Retinal Ganglion Cells Promotes Long-Distance Optic Nerve Regeneration. *Cell Reports* 31, 107537.

Wang, Z., Reynolds, A., Kirry, A., Nienhaus, C., and Blackmore, M.G. (2015). Overexpression of Sox11 Promotes Corticospinal Tract Regeneration after Spinal Injury While Interfering with Functional Recovery. *Journal of Neuroscience* 35, 3139–3145.

Figure 1

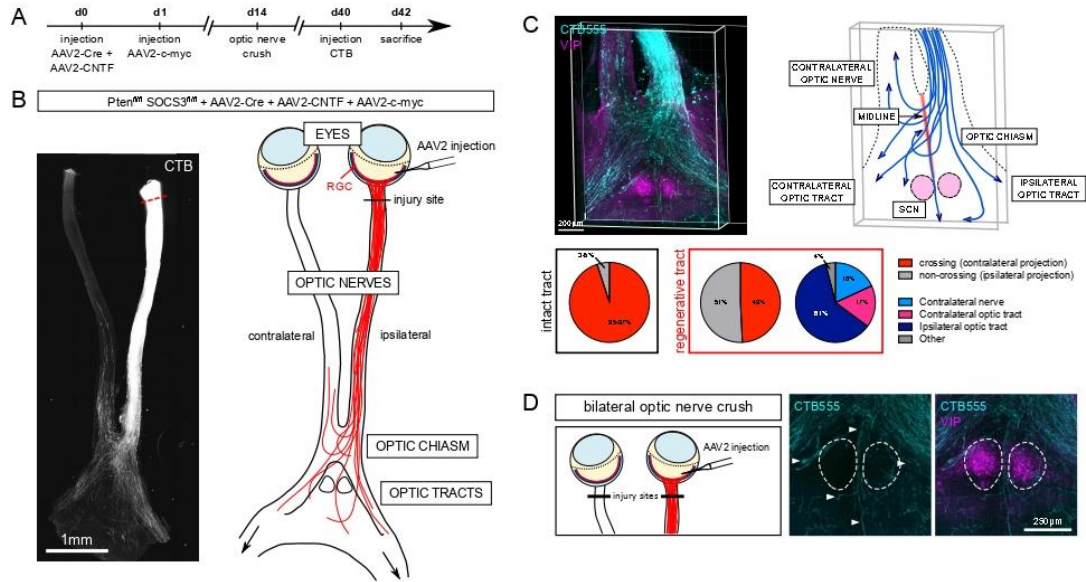


Figure 2

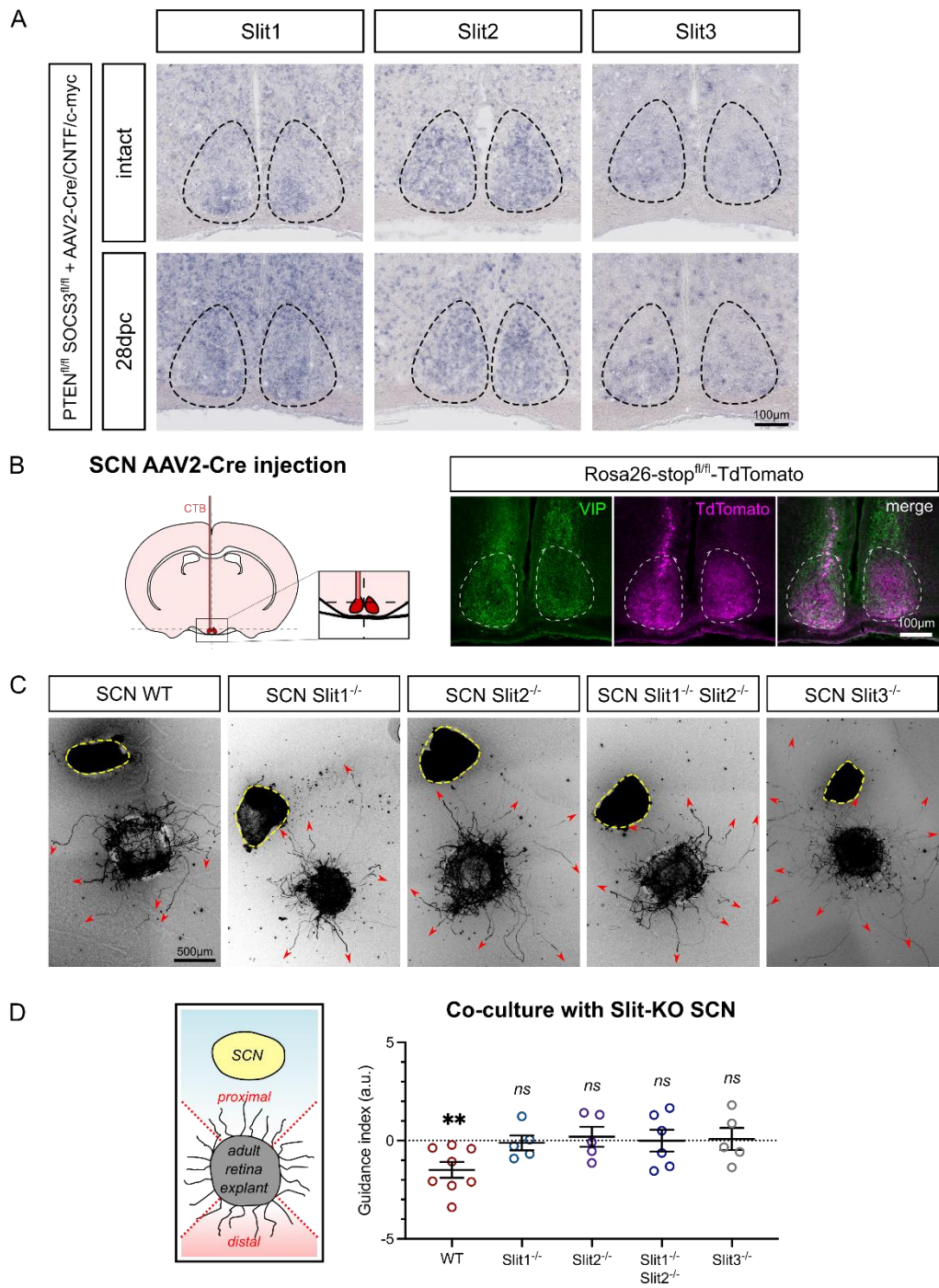


Figure 3

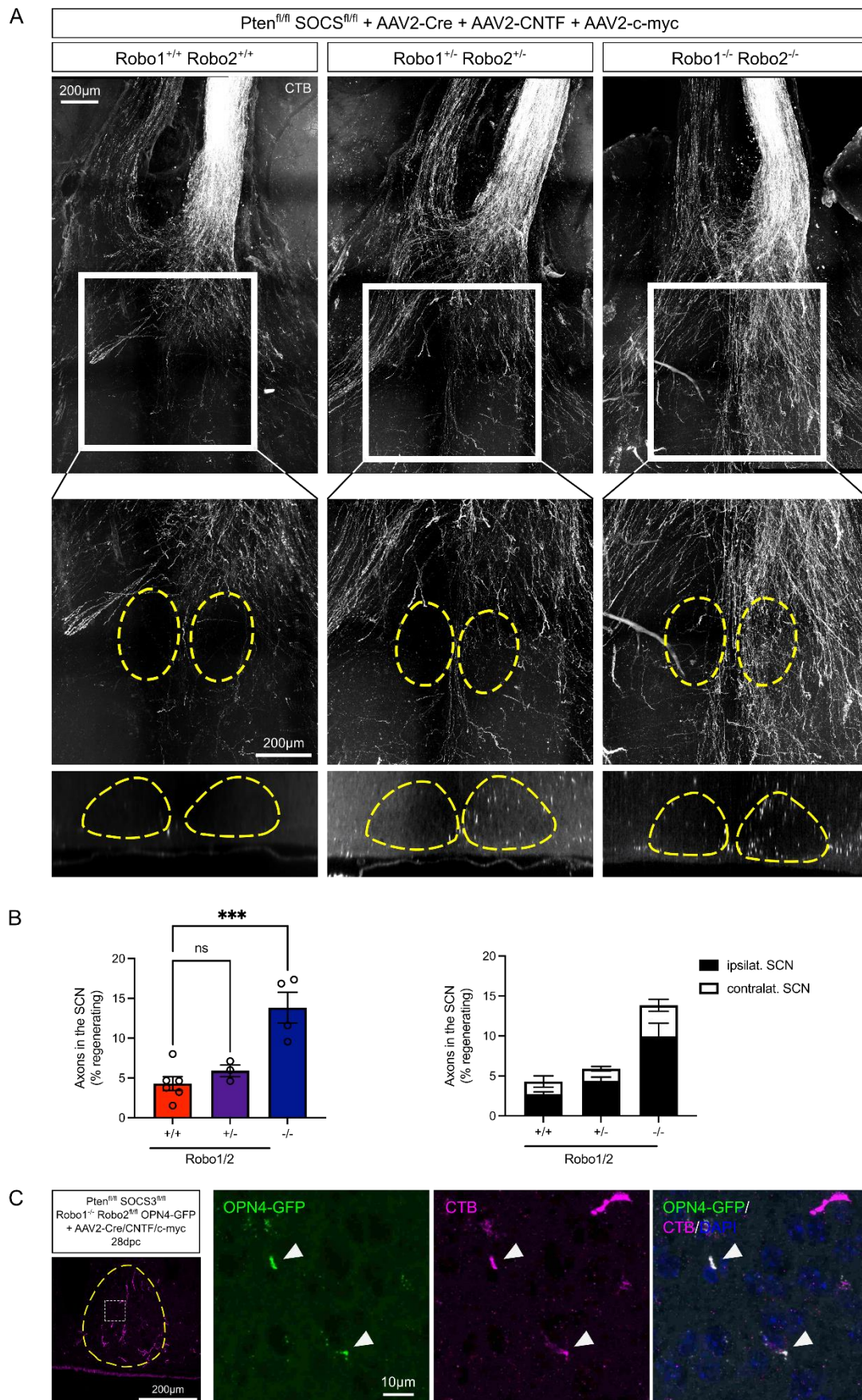
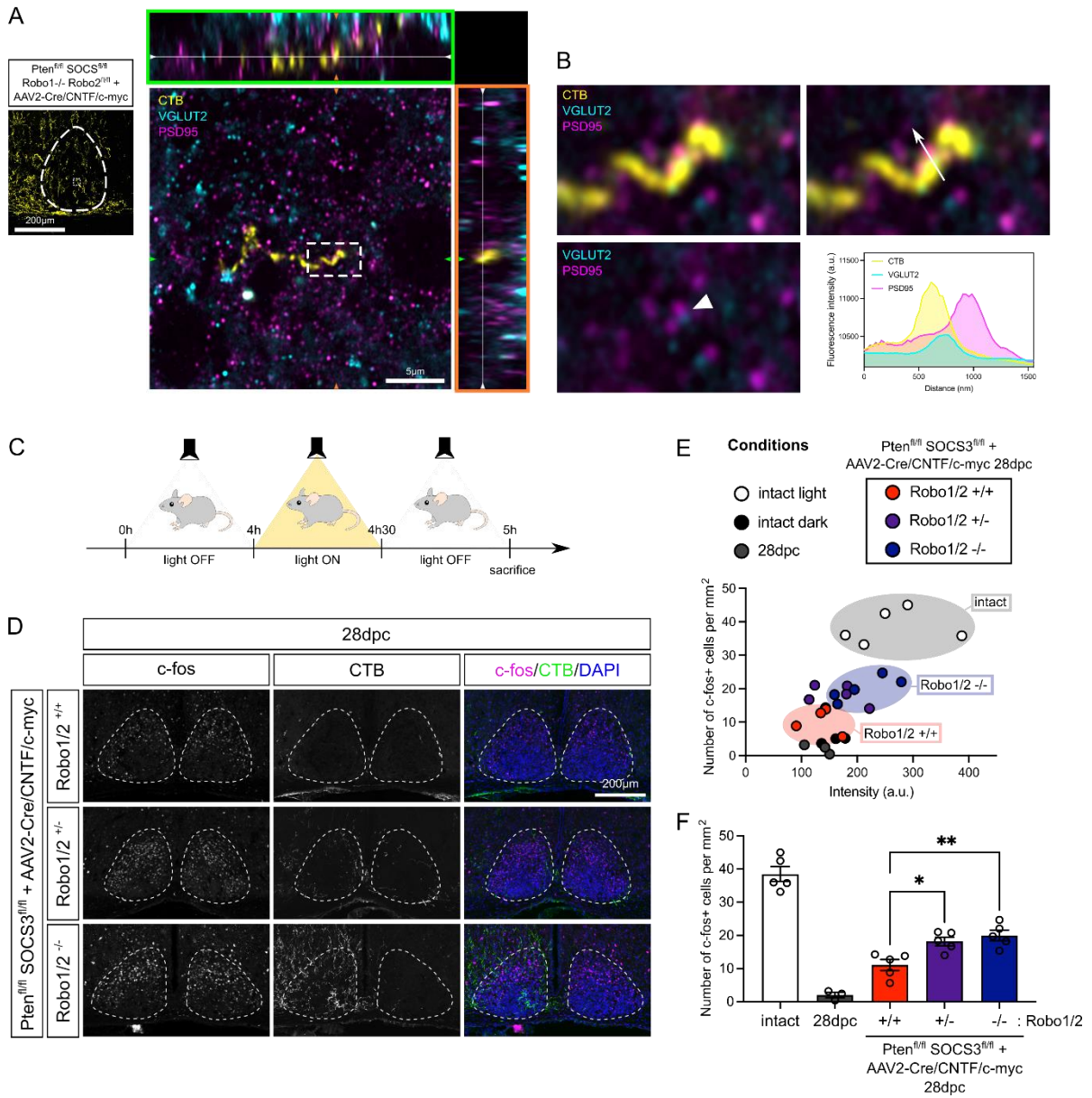
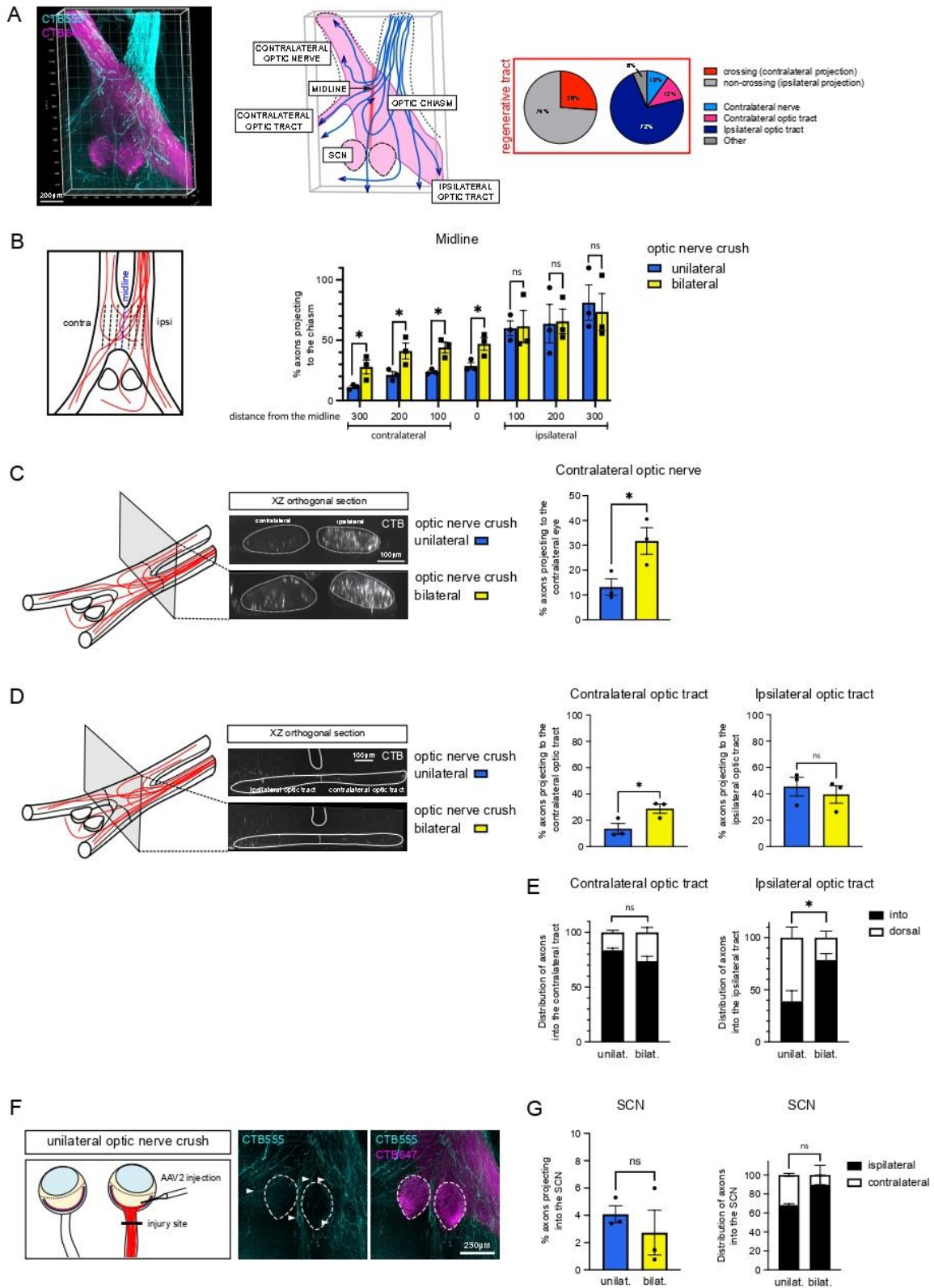


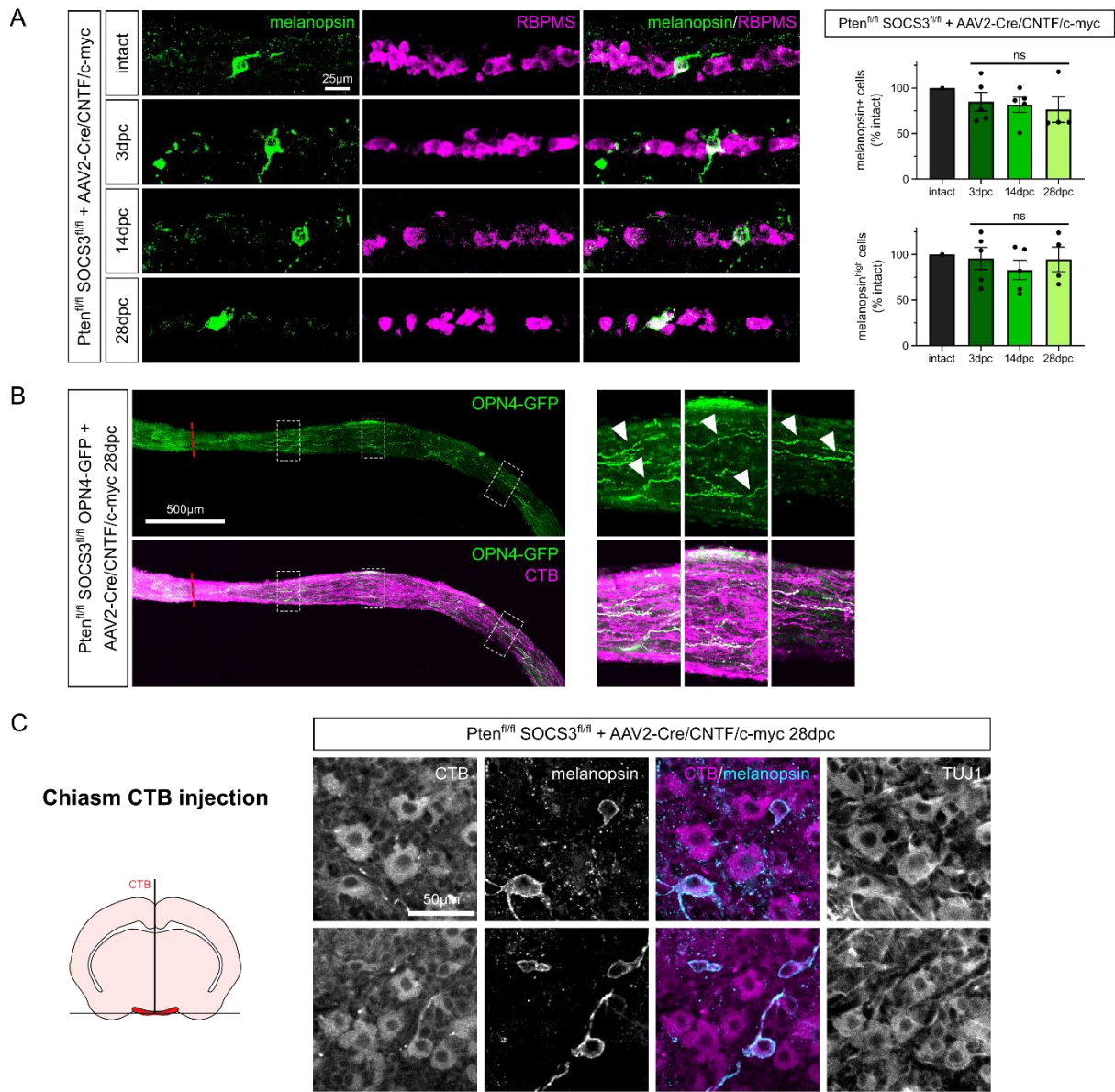
Figure 4



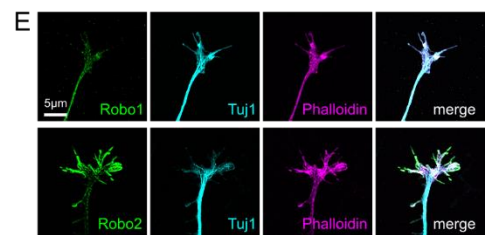
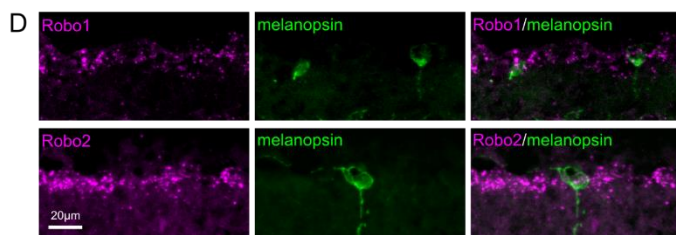
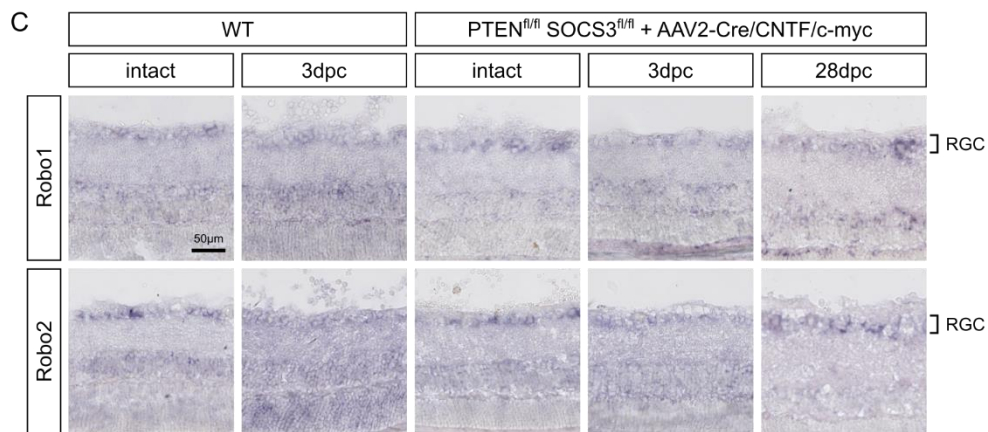
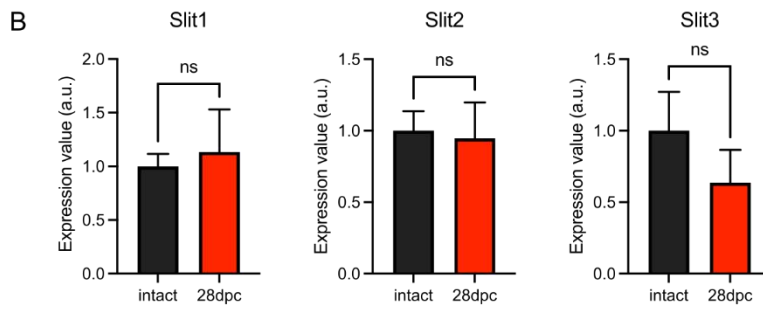
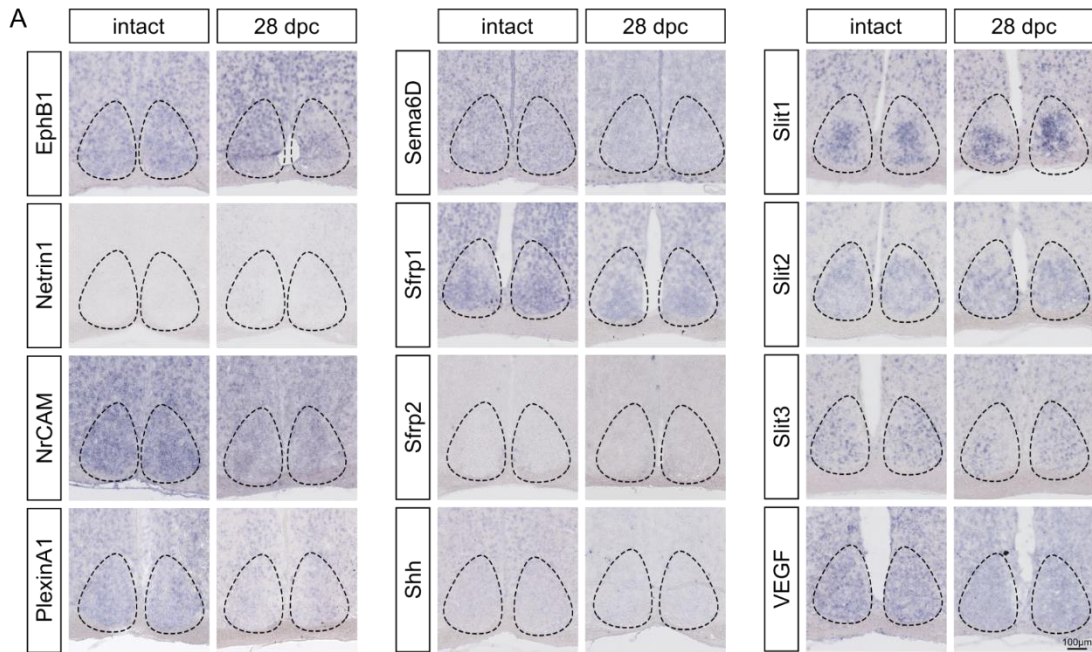
Supplementary Figure 1



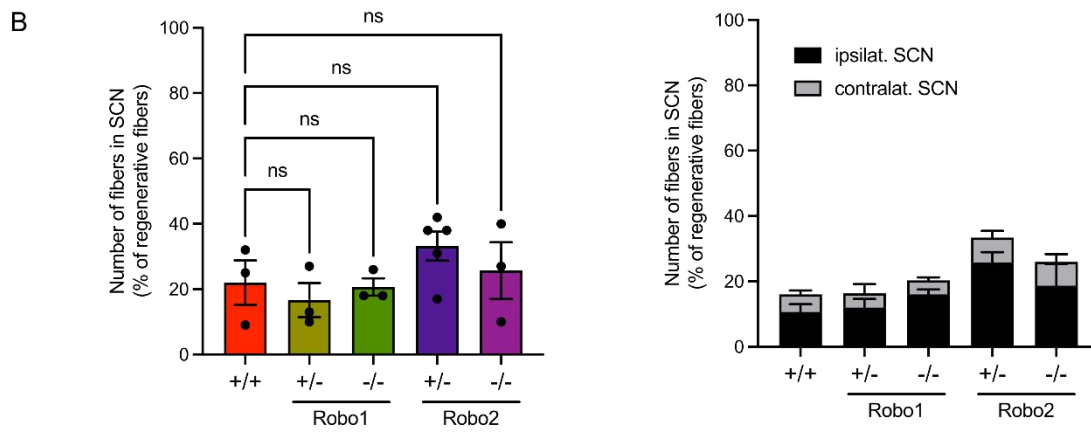
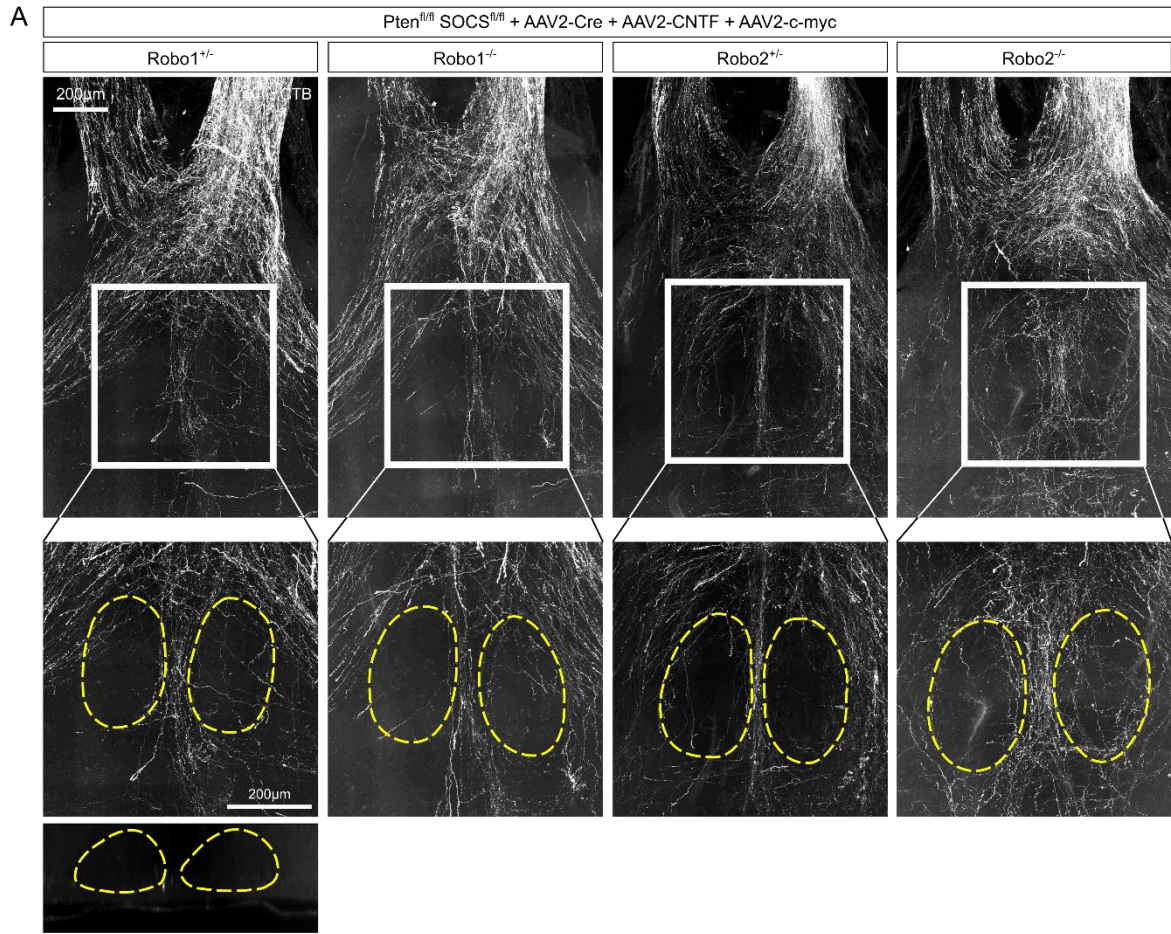
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3

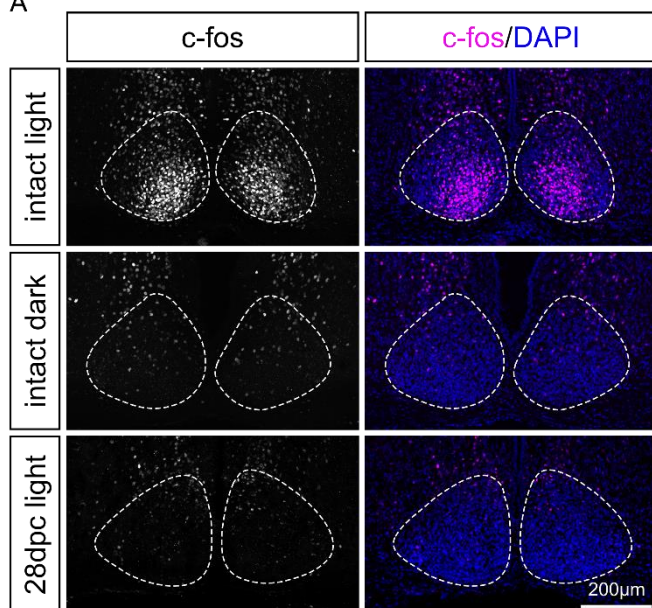


Supp Figure 4

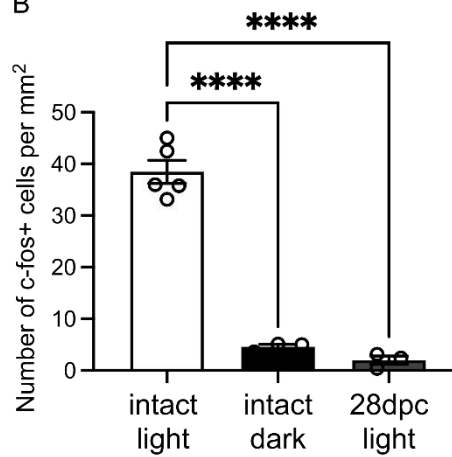


Supplementary Figure 5

A



B



DISCUSSION et PERSPECTIVES

Toutes atteintes du système nerveux central (SNC) qu'elles soient traumatiques ou la conséquence de maladies neurodégénératives conduisent à des pertes irréversibles des fonctions motrices, cognitives et/ou sensorielles. En effet, le SNC est incapable de régénérer contrairement au système nerveux périphérique. C'est pourquoi la régénération du SNC est un domaine de recherche essentiel ayant pour objectif la reconstruction des circuits nerveux fonctionnels pour les patients. C'est dans cette optique que des chercheurs ont mis au point des approches génétiques qui promeuvent une régénération à longue distance des axones du SNC (Park et al. 2008; He et Jin 2016). Parmi ces approches, les plus convaincantes et efficaces reposent sur la combinaison de différentes modulations génétiques. C'est le cas du modèle PSM que nous utilisons dans le laboratoire : il combine l'activation des voies mTOR (par délétion de son inhibiteur **PTEN**), JAK/STAT (par surexpression de CNTF et délétion de **SOCS3**) et c-myc (surexpression de **c-myc**) (Belin et al. 2015). Pour ce faire, nous utilisons le système visuel et le modèle de lésion par pincement du nerf optique. Nous modulons l'expression génétique des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) qui sont les neurones envoyant leur axone jusqu'au cerveau via le nerf optique. Ainsi, nous obtenons une régénération robuste à longue distance qui s'étend de l'œil jusqu'au cerveau. Cependant, nous observons de graves défauts de guidage de la part des axones qui régénèrent. En effet, ces derniers semblent perdus : ils ne se connectent pas au bon endroit et peuvent même créer des connexions aberrantes qui pourraient compromettre le retour des fonctions normales (Wang et al. 2015). De plus, on ne sait pas combien d'axones reconnectés sont nécessaires au bon fonctionnement du circuit (de Lima et al. 2012; Wang et al. 2015).

Par ailleurs, en utilisant ce type d'approches, plusieurs chercheurs ont montré une réinnervation des cibles cérébrales s'accompagnant d'un retour des fonctions. C'est le cas de de Lima et collaborateurs, utilisant la délétion de PTEN associée à l'injection de Zymosan et d'AMPC. Cependant, les résultats obtenus dans cette étude ne semblent pas pouvoir être reproduits, en découle l'absence de publications reposant sur ce modèle de régénération (de Lima et al. 2012). D'autre part, Lim et ses collaborateurs combinent l'activation de la voie mTOR avec une stimulation visuelle et obtiennent une réinnervation de différentes cibles visuelles (NSC, dLGN, vLGN, OPN, MTN, SCol) ainsi qu'un retour partiel des fonctions (Lim et al. 2016). Toutefois, les tests de comportement ayant pour but d'évaluer le retour de l'acuité visuelle, ont été réalisés sur des groupes d'animaux assez petits (n=3). De plus, le nombre d'axones parvenant aux différentes cibles est également faible et les expériences réalisées ne semblent pas avoir pu être reproduites par la suite. Ceci soulève l'hypothèse d'une lésion incomplète et de la présence d'axones non lésés résiduels. Le manque de robustesse dans

ces études laisse le champ libre à de nouvelles méthodes dans le but de réparer le système nerveux central lésé notamment en guidant les axones qui régénèrent jusqu'à leurs cibles cérébrales correctes.

L'étude du guidage axonal est primordiale dans le contexte de la régénération chez l'adulte pour pouvoir permettre la reconstruction des circuits nerveux. Effectivement, le guidage axonal a été largement étudié au cours du développement puisqu'il s'agit de la période pendant laquelle les neurones en cours de croissance projettent leur axone sur de très longues distances pour créer et connecter tous les circuits neuronaux que l'on retrouve chez l'adulte. J'ai donc dans un premier temps **caractérisé l'expression des molécules de guidage dans le système visuel adulte en condition intacte.** Je me suis ensuite intéressée à **l'effet de la lésion du nerf optique sur leur expression** dans les différentes cibles cérébrales des CGR. Enfin, dans une deuxième partie, j'ai mis à profit nos connaissances des molécules de guidage dans le cerveau adulte pour **moduler l'expression** de certaines d'entre elles afin de modifier la navigation des axones en cours de régénération et de permettre la reconnexion d'une de leur cible spécifique : le noyau suprachiasmatique. J'ai ainsi mis en évidence l'importance de prendre en compte le guidage axonal dans les thérapies visant à reconstruire les circuits nerveux après une lésion dans un système mature. Ces résultats novateurs amènent toutefois des questions et de nouvelles perspectives qui seront évoquées dans cette partie.

I – Défis techniques

A – Approches *ex vivo*

Le guidage axonal a principalement été étudié au cours du développement. L'observation de la navigation axonale dans un système en cours de croissance est facilement réalisable. En effet, on peut mettre en culture des explants de tissus embryonnaires (notamment de rétine) et décrire les projections des axones qui en sortent aussitôt. Cependant, l'étude du guidage *in vivo* dans un système mature est beaucoup plus complexe. De fait, un explant de tissu provenant du SNC adulte n'est pas capable de régénérer. C'est pourquoi, afin d'étudier la réponse des axones adultes aux molécules de guidage environnantes, nous avons mis en place des manipulations de cultures d'explants rétinien adultes provenant de souris ayant des capacités régénératives (PTEN^{-/-}SOCS3^{-/-} ou PTEN^{-/-}SOCS3^{-/-} + CNTF + c-myc). Nous avons optimisé cette mise en culture pour permettre à l'explant de rester fixé sur un substrat et aux axones de pouvoir en sortir pour pousser (Schaeffer et al. 2020).

Nous avons décrit que les molécules de guidage sont toujours exprimées dans le système visuel adulte (Vilallongue et al. 2022). Grâce à l'analyse d'études transcriptomiques, nous savons que les récepteurs à ces molécules sont exprimés par les CGR adultes (Rheume et al. 2018; Tran et al. 2019). D'une part, afin de savoir si ligand et récepteur sont toujours capables d'interagir ensemble dans un système mature et afin de définir le type de réponse

qu'ils engendrent, nous avons combiné nos cultures d'explants qui régénèrent avec une manipulation de stripe assay. Nous avons transposé cette manipulation qui se fait principalement au cours du développement (Knöll et al. 2007) sur notre modèle adulte de régénération. Ainsi, nous avons pu analyser la préférence des axones qui régénèrent par rapport à une molécule de guidage d'intérêt, et définir si les axones répondaient toujours à ces facteurs chez l'adulte.

D'autre part, après avoir observé l'évitement du noyau suprachiasmatique (NSC) par les axones en cours de régénération, nous avons utilisé une approche candidat et montré que les molécules répulsives Slit1, Slit2 et Slit3 étaient exprimées dans le NSC. Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle les Slits seraient responsables de cette absence d'innervation, nous voulions déterminer si les axones en cours de régénération répondaient à ces ligands. Pour cela, nous avons mis en place une expérience de coculture avec des explants rétiniens PSM adultes et des explants de NSC adultes. J'ai microdisséqué les NSC provenant de différentes lignées de souris afin d'avoir les conditions suivantes : un NSC exprimant Slit1, Slit2 et Slit3 (WT), ou Slit1 et Slit2, ou Slit1 seulement, ou Slit2 seulement, ou aucun Slit. Nous avons ainsi pu décrire que les axones en cours de régénération évitent le NSC sauvage, qui exprime les Slits, et qu'ils poussent dans des directions aléatoires (même en direction du NSC) lorsque les Slits sont délétés. La mise en place de cette manipulation est complexe puisqu'il faut isoler correctement les différents explants (de rétine et de NSC), il faut ensuite les mettre en culture en les fixant sur un substrat, et enfin, pour observer la pousse des axones en 3D, il est nécessaire d'emprisonner les deux explants dans un dôme de collagène, sans que le tout ne se décolle. De plus, pour la mise en place de cette expérience, il faut d'abord obtenir les NSC exprimant différemment les Slits.

B – Chirurgie stéréotaxique et modulation des facteurs de guidage *in vivo*

Pour cette étape préalable, j'ai mis en place une chirurgie stéréotaxique afin de moduler l'expression des Slits directement dans le NSC de souris adultes. La chirurgie stéréotaxique est largement utilisée dans le domaine des neurosciences. Cependant, l'injection de virus dans le NSC n'est pas répandue. En effet, le NSC est une très petite structure de 10 000 cellules qui se trouvent dans la partie ventrale du cerveau. Il a donc fallu définir les coordonnées permettant de viser le NSC spécifiquement tout en évitant les dommages tels que des hémorragies dues à la traversée complète du cerveau. De plus, une fois les coordonnées définies, il est nécessaire de les ajuster selon la souche de souris utilisée ainsi que leur âge.

Après la modulation des récepteurs Robos dans les CGR, nous observons que leurs axones entrent à nouveau dans le NSC. Nous savons que le NSC est normalement innervé par la sous-population des CGRip. Afin de déterminer quelles sont les CGR qui reconnectent le NSC, j'ai mis à profit mon expertise en chirurgie stéréotaxique pour injecter un virus rétrograde dans

le NSC et repérer quelles sont les CGR qui l'expriment au niveau de la rétine. Pour cela, j'ai d'abord développé un virus Cre-recombinase exprimé sous un promoteur spécifique du NSC, afin d'exprimer les virus exclusivement dans ce noyau. J'ai réalisé une première injection de cette Cre et du TVA (protéine conférant la compétence d'infection aux virus de la rage) dans le NSC et une semaine après, j'ai injecté au même endroit le virus de la rage. A l'heure actuelle, je conduis une expérience contrôle sur des souris TdTomato intactes afin d'observer le virus de la rage dans les CGRip de la rétine. Je réaliserai prochainement cette manipulation sur les souris PSRR dont les axones régénèrent et rentrent à nouveau dans le NSC. Ces manipulations sont très complexes puisqu'elles nécessitent une parfaite optimisation en amont et consistent à deux injections très précises, au même endroit dans le cerveau avec un intervalle d'une semaine les séparant, sans compter les risques pour la survie de l'animal. Toutefois, cette expérience fonctionne en laboratoire et permettra de répondre à notre interrogation sur l'identité des CGR qui reconnectent le NSC dans notre modèle PSRR.

C – Imagerie

Enfin, pour observer les projections des axones dans le modèle PSM puis dans le modèle PSRR, nous avons également optimisé un protocole de transparençation permettant de visualiser leur navigation en 3D. Cette étape était essentielle pour l'observation adéquate de nos résultats et leur analyse.

II – Conclusions

Dans le premier projet, nous avons réalisé la carte d'expression des molécules de guidage dans les différentes cibles du système visuel adulte ([Vilallongue et al. 2022](#)) ; nous allons discuter ici des expériences qui pourraient être réalisées ensuite.

Grâce aux études transcriptomiques des CGR adultes en condition intacte et pendant la régénération de Rheume et ses collaborateurs ([Rheume et al. 2018](#)) et de Tran et ses collaborateurs ([Tran et al. 2019](#)), nous avons pu décrire que les transcrits des récepteurs des molécules de guidage sont également exprimés chez l'adulte. Toutefois, il serait intéressant de se focaliser sur l'expression protéique de ces récepteurs. Tel que réalisé par Belin et ses collaborateurs, une analyse de spectrométrie de masse pourrait être conduite après un tri cellulaire des CGR adultes en condition intacte et 28 jours après la lésion, afin d'obtenir les cartes d'identité de guidage de chaque CGR ([Belin et al. 2015](#)). Dans cette étude, le précurseur de PlexinA1 est notamment mis en évidence. Il serait intéressant de définir si les différentes sous-populations de CGR ont des signatures de guidage différentes ou non au niveau protéique.

De plus, dans le projet de réinnervation du NSC, nous nous sommes focalisés sur les récepteurs Robos des molécules répulsives Slits. Cependant, les Slits, notamment Slit2, interagissent également avec PlexinA1 ([Delloye-Bourgeois et al. 2015](#)). La caractérisation de l'expression de PlexinA1 dans les CGR adultes serait ainsi pertinente. En effet, peut-être qu'en délétant PlexinA1 en plus des Robos, on potentialiserait l'effet observé et améliorerait la réinnervation du noyau suprachiasmatique. De surcroît, dans notre modèle de réinnervation du NSC (modèle PSRR), les axones entrent dans le noyau dorsalement. Cependant, pendant le développement, ils innervent le NSC par le côté ventral. Nous pouvons imaginer que la délétion des Robos dans les CGR privilégie l'interaction des récepteurs Plexins présents sur les cônes de croissance des CGR en cours de régénération avec les Slits exprimés dans le NSC, ce qui modifierait spatialement le point d'entrée des axones.

Afin de prouver que la modulation du guidage chez l'adulte était possible, nous ne nous sommes focalisés que sur deux phénomènes : la traversée de la ligne médiane ([Vilallongue et al. 2022](#)) et l'innervation du NSC qui est la première cible rencontrée par les CGR au cours de leur régénération. Il faudrait observer jusqu'où les axones de notre modèle de régénération arrivent dans le cerveau adulte et étudier la réinnervation des cibles plus distales telles que le dLGN et le SCol. On pourrait également mettre en place des chirurgies stéréotaxiques afin d'atteindre ces autres cibles et de moduler l'expression de molécules de guidage pour permettre leur réinnervation.

De plus, il est fort probable que des molécules de guidage soient également présentes tout le long de la navigation des axones, pas qu'au niveau de leur cible. Une des observations qui pourrait le confirmer est le fait que certains axones des CGR dans notre modèle PSM retournent dans l'œil dont ils proviennent et d'autres vont connecter le deuxième œil. Ces trajectoires aberrantes semblent toutefois définies et pourraient faire intervenir des molécules de guidage localement dans les nerfs optiques et les tractus. En effet, une étude récente montre que des connexions rétine-rétine ont lieu pendant le développement ([Murcia-Belmonte et al. 2019](#)). Cette communication entre les deux yeux semble nécessaire pour permettre la coordination bilatérale du raffinement axonal. Peut-être que les axones projetant d'un œil vers l'autre pendant la régénération récapitulent des mécanismes du développement. Il serait donc intéressant de décortiquer la composition en molécules de guidage de tous les tractus empruntés par les axones pour avoir une vue d'ensemble sur la carte de guidage dans le système visuel adulte. Ceci pourrait se faire en microdisséquant les nerfs optiques et les tractus ainsi que les tissus cérébraux avoisinants pour les analyser en spectrométrie de masse et définir les facteurs de guidage qui s'y cachent.

III – Perspectives

A – Régulation spatio-temporelle des molécules de guidage

L'étude de l'expression des molécules de guidage au cours du développement et de l'innervation du dLGN en tant que preuve de concept (Vilallongue et al. 2022), montre qu'une chorégraphie millimétrée a lieu et ce, probablement dans toutes les cibles cérébrales. En effet, l'expression des facteurs de guidage est finement régulée au cours du temps et dans l'espace, au sein-même du dLGN, et chaque molécule possède sa propre chorégraphie. Cette régulation fine est nécessaire pour la bonne innervation du dLGN et des autres cibles. Elle repose notamment sur des changements de réponse (attractive vers répulsive et inversement) tels qu'observés au cours de la décussation au niveau du chiasma optique (décrite dans le chapitre 2 – VI de l'introduction) ou des modulations d'expression des molécules ou de leurs récepteurs. En effet, des modifications transcriptionnelles et traductionnelles régulent l'expression des facteurs de guidage et de leurs récepteurs, leur conférant cette rapidité de changement de réponses (Stoeckli 2018). D'une part, il semble que les axones commencent à exprimer des récepteurs sur leur cône de croissance quand ils s'approchent d'une cible intermédiaire ou finale : cette modification transcriptionnelle n'est pas encore bien définie. Par exemple, Shh induit l'expression de Hhip (son récepteur sur les axones qui ont déjà traversé la ligne médiane) une fois que l'axone a passé la ligne médiane (Bourikas et al. 2005; Wilson et Stoeckli 2013). D'autre part, des modifications traductionnelles régissent l'expression des molécules de guidage. Par exemple, la sensibilité des axones des CGR à Sema3A est régulée par le contrôle traductionnel de Neuropilin1 par des micro-ARN (Baudet et al. 2011).

Nous avons déterminé que les molécules de guidage exprimées dans le système visuel adulte sont stables au cours du temps et même après la lésion. Cette carte de guidage immuable contribue à l'impossibilité de réinnervation des régions cérébrales. C'est pourquoi, il sera nécessaire de décortiquer l'évolution de l'expression de chaque facteur impliqué dans l'innervation d'une cible pour pouvoir la retranscrire dans un contexte de régénération et permettre la réinnervation. Il s'agit ici d'un premier niveau de complexité à prendre en compte pour permettre la reconstruction des circuits lésés.

B – Interaction entre les molécules de guidage et régulations

Pendant le développement, le guidage axonal ne consiste pas seulement en l'interaction entre un ligand présent dans l'environnement et son récepteur exprimé sur le cône de croissance au bout de l'axone. En effet, il existe de nombreux exemples de communication (« crosstalk ») entre différents facteurs de guidage. C'est le cas de Netrin1 qui a besoin de Shh et VEGF pour attirer les axones commissuraux à la « plaque du plancher » (« floor plate » FP) (Charron et al. 2003), ou encore les Slits qui repoussent les axones ayant déjà traversé la FP, qui travaillent en association avec les Sema3 (Zou et al. 2000; Nawabi et al. 2010). Il faudra donc

déterminer si ces interactions existent chez l'adulte et les prendre en compte afin de promouvoir une navigation optimale des axones en cours de régénération permettant *in fine* une reconstruction du circuit neuronal.

C – Hétérogénéité dans la rétine

Dans le contexte de la régénération, nous nous intéressons particulièrement aux cellules ganglionnaires de la rétine (CGR). Celles-ci sont constituées de 46 sous-populations différentes de neurones (Tran et al. 2019). Lorsqu'on réalise la lésion du nerf optique par pincement, on affecte toutes les CGR puisqu'elles envoient toutes leur axone dans le nerf optique pour connecter le cerveau. Cependant, les CGR ont des réponses différentes à la lésion selon leur catégorie. En effet, certaines sous-populations de CGR survivent mieux à la lésion que d'autres. Par exemple, 80% des α -CGR survivent après la lésion des nerfs optiques ainsi que 70% des CGRip M1 (Duan et al. 2015). Une étude basée sur une analyse single-cell de l'ARN des CGR adultes montrent qu'il existe 46 sous-types de CGR qui possèdent des signatures transcriptomiques différentes (Tran et al. 2019). Ces résultats mettent en évidence que le potentiel de résilience des différentes sous-populations de CGR n'est pas le même. Cette hétérogénéité au sein de la rétine concerne la capacité de survie des CGR mais aussi leur potentiel de régénération. En effet, toutes les CGR ne sont pas modulables de la même manière, c'est-à-dire qu'un neurone a sa propre réponse à une modulation moléculaire (Duan et al. 2015; Tran et al. 2019). Une étude récente montre par exemple que la surexpression de Sox11 dans les CGR promeut la régénération des CGR non- α alors qu'elle tue les CGR- α (Norsworthy et al. 2017). Une autre analyse a démontré que les CGRip étaient à la fois des neurones résistants à la lésion et qu'ils étaient prompts à régénérer (Bray et al. 2019).

Pour permettre la reconstruction fonctionnelle du circuit nerveux, il faudra donc trouver un moyen de faire régénérer toutes les sous-populations de CGR pour ainsi leur permettre de reconnecter correctement leurs cibles spécifiques. Cette hétérogénéité de la rétine soulève également la question de la réponse spécifique aux molécules de guidage selon la nature du neurone en cours de régénération : peut-être qu'une CGR- α pourra répondre à une molécule de guidage mais pas une CGR non- α . Ceci ajoute un niveau de complexité supplémentaire à prendre en considération pour la reformation du circuit.

Grâce aux différentes lignées de souris rapportrices pour les différentes sous-populations de CGR (Tran et al. 2019), il serait intéressant d'étudier et de définir la réponse de chacune d'entre elles aux molécules de guidage.

D – Réinnervation des cibles cérébrales

1 – Nombre d'axones nécessaires et leur identité

Les modèles de régénération à longue distance permettent d'envisager une reconnexion des circuits neuronaux. Toutefois, on ne sait pas combien d'axones doivent se reconnecter à leurs

cibles pour que le circuit soit de nouveau fonctionnel. En effet, dans notre modèle de régénération et de réinnervation du NSC nommé PSRR (PTEN^{-/-}SOCS3^{-/-}Robo1^{-/-}Robo2^{-/-} + CNTF + c-myc), on observe que le nombre d'axones qui entrent à nouveau dans le NSC est significativement augmenté. Cependant, on ne sait pas s'ils suffisent à réactiver la fonction du NSC. De plus, il nous faudra définir les sous-populations des CGR qui envoient leur axone dans le NSC. Comme évoqué précédemment, les CGRip innervent normalement le noyau et l'expérience de traçage rétrograde avec le virus de la rage nous permettra de vérifier l'identité des neurones qui connectent le NSC. Il n'est pas exclu que d'autres sous-populations de CGR projettent leur axone dans le NSC tout en permettant son bon fonctionnement. En effet, on peut imaginer qu'un autre type neuronal que les CGRip pourrait transmettre une information lumineuse aux neurones du NSC dans notre modulation de régénération.

Il faudrait donc définir un nombre d'axones nécessaires au re-fonctionnement des cibles du système visuel et déterminer si l'identité des neurones qui envoient leur axone est essentielle à l'activité de la cible.

2 – Projections ipsi- et controlatérales

Nous savons que les cibles du système visuel sont connectées à 95% par les projections controlatérales et à 5% par les axones ipsilatéraux, à l'exception du NSC qui reçoit la même proportion des deux types de projections. En effet, certains axones des CGRip qui innervent le NSC créent une collatérale lorsqu'ils arrivent en face du noyau permettant à un neurone de connecter les deux parties (Fernandez et al. 2016). Dans notre modèle PSRR de réinnervation du NSC, nous n'avons pas observé ce phénomène de dédoublement d'axones. Il serait probablement nécessaire de définir les mécanismes moléculaires à l'origine de ce processus et de les appliquer chez l'adulte dans un contexte de régénération pour permettre une réinnervation correcte du NSC à 50%-50% par les projections ipsi- et controlatérales.

Des études ont permis de mettre en évidence que les CGR avaient une signature transcriptomique particulière selon si elles projettent ipsilatéralement ou controlatéralement (Wang et al. 2016). Il faudrait vérifier si cette signature est conservée pendant la régénération et sinon, une modulation des CGR serait nécessaire pour permettre une bonne décussation des axones.

3 – Cartes rétinotopiques

Comme décrit dans l'introduction, les axones des CGR ne connectent pas aléatoirement les cibles du système visuel. Chaque sous-population de CGR qui innerve une cible le fait dans une partie spécifique de celle-ci (Figure 4). De plus, il en est de même pour les projections ipsi- et controlatérales qui ont un positionnement bien particulier. Dans le dLGN, par exemple, les projections ipsilatérales se concentrent au centre du noyau et sont entourées par toutes les projections controlatérales. Il serait intéressant d'étudier de quelle manière les axones en

cours de régénération réinnerveraient le dLGN. Ainsi, on pourrait déterminer si les mécanismes moléculaires mis en jeu pendant l'innervation initiale du noyau sont maintenus chez l'adulte pendant la régénération.

4 – Stabilité et maintien des synapses

Au cours du développement, quand un axone rencontre sa cible, une synapse se forme. Celle-ci va soit être renforcée et conservée, soit elle va être élaguée par le mécanisme appelé « pruning ». Ce phénomène est notamment observable au cours de l'innervation du dLGN (Kerschensteiner et Guido 2017). Comme indiqué dans l'introduction, les molécules de guidage sont fortement impliquées dans ces mécanismes.

Il serait intéressant d'observer si la réinnervation des cibles pendant la régénération conserve ces mécanismes de premières connexions, renforcement et pruning. De plus, si la réinnervation des cibles cérébrales implique une modulation de l'expression des molécules de guidage, il faudra être vigilant sur l'effet de cette modification sur le pruning mais aussi le maintien de la stabilité synaptique.

En effet, pour valider la réinnervation des cibles, il est primordial d'étudier la stabilité du circuit nouvellement formé dans le temps. Il faudra alors s'assurer que les molécules de guidage continuent de jouer leurs rôles dans la formation des synapses, l'élagage, la formation de la mémoire et la plasticité.

E – Myélinisation des axones régénérés

La myélinisation est essentielle pour la conduction rapide des informations par les axones. Malgré la possibilité de régénération des axones du SNC grâce aux modulations moléculaires, le retour des fonctions, s'il a lieu, reste très partiel (He et Jin 2016; de Lima et al. 2012). En effet, le manque de myélinisation des axones nouvellement régénérés empêche la conduction des informations lumineuses. Par exemple, Bei et ses collaborateurs ont montré que malgré une approche combinatoire menant à une forte régénération et même à la formation de synapses fonctionnelles, les potentiels d'action n'étaient pas transmis entre l'œil et le colliculus supérieur à cause du manque de myélinisation des axones (Bei et al. 2016). En administrant des bloqueurs de canaux de potassium voltage-dépendant, ils ont augmenté la conduction de l'information dans les axones non-myélinisés et ont amélioré l'acuité visuelle des animaux, soulignant l'importance de la conduction de l'information. C'est pourquoi la remyélinisation des axones régénérés contribuerait aux retours des fonctions. Dans cet objectif, Wang et ses collaborateurs ont mis en évidence que les précurseurs des oligodendrocytes (OPCs) proliféraient après une lésion du nerf optique mais qu'ils ne parvenaient pas à se différencier en oligodendrocytes matures possédant la capacité de myélinisation. La lésion induit une surexpression de GPR17 qui inhibe la transition des OPCs et une activation de la microglie

qui fait de même. Ainsi, en bloquant GPR17 et la microglie, ils ont permis une remyélinisation des axones qui ont régénéré (Wang et al. 2020).

Pour permettre le retour des fonctions il faudrait donc combiner : régénération, modulation du guidage axonal et remyélinisation.

F – Être prudent en modulant les molécules de guidage

1 – Ne pas affecter les fonctions physiologiques des molécules de guidage chez l'adulte

Comme discuté dans le dernier chapitre de l'introduction, les molécules de guidage jouent de nombreux rôles physiologiques chez l'adulte (mise en place de la cicatrice gliale, participation à la régénération dans le SNP, rôle dans la formation et la stabilisation des synapses, communication cellulaire et maintien des niches de cellules souches). Lorsque nous modulons l'expression des molécules de guidage pour permettre la bonne navigation des axones en cours de régénération jusqu'à leurs cibles, il faut garder en tête que ces dernières ont des rôles importants dans la physiologie adulte. Il faudra donc réaliser ces modulations très ponctuellement et localement pour que les molécules de guidage puissent continuer d'assurer leurs rôles physiologiques.

2 – Attention aux conséquences

Il a été démontré qu'une modification dans l'expression des molécules de guidage peut avoir des conséquences dramatiques. En effet, ces modifications qui apparaissent de manière spontanée, conduisent au vieillissement (Bisaz et al. 2013), mais plus sévèrement à des troubles neurologiques (Sheng, Leshchyn'ska, et Sytnyk 2015; Lesnick et al. 2007; Antonell et al. 2013) et à des cancers (Dallol et al. 2003; Biankin et al. 2012).

C'est pourquoi la modulation du guidage pour permettre la redirection des axones en cours de régénération doit se faire très prudemment pour ne pas obtenir des effets secondaires indésirables.

Pour conclure, nous avons démontré que la régénération axonale ne suffit plus pour promouvoir la reconstruction des circuits neuronaux après une lésion. En effet, les graves défauts de guidage observés soulignent l'importance de moduler le guidage axonal chez l'adulte. Cependant, cette modulation est très difficile puisqu'elle doit tenir compte de différents niveaux de complexité : régulation spatio-temporelle de l'expression des molécules de guidage, interaction entre les facteurs de guidage, hétérogénéité de réponses des CGR dans la rétine (différentes sous-populations), réinnervation correcte des cibles (cartes rétinotopiques, nombre d'axones nécessaires, projections ipsi- et controlatérales, stabilité et maintien des synapses), myélinisation des axones régénérés. Et enfin, cette modulation ne doit pas altérer les fonctions physiologiques assurées par les molécules de guidage chez

l'adulte ni conduire au développement de pathologies. La route est encore longue, mais nos travaux contribuent à faire avancer les connaissances sur le guidage axonal chez l'adulte et sur le fait que sa modulation est possible et très prometteuse pour la reconstruction des circuits neuronaux.

REFERENCES

- Abrahamson, Eric E, et Robert Y Moore. 2001. « Suprachiasmatic Nucleus in the Mouse: Retinal Innervation, Intrinsic Organization and Efferent Projections ». *Brain Research* 916 (1-2): 172-91. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02890-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02890-6).
- Ahmad-Annur, Azlina, Lorenza Ciani, Iordanis Simeonidis, Judit Herreros, Naila Ben Fredj, Silvana B. Rosso, Anita Hall, Stephen Brickley, et Patricia C. Salinas. 2006. « Signaling across the synapse: a role for Wnt and Dishevelled in presynaptic assembly and neurotransmitter release ». *The Journal of Cell Biology* 174 (1): 127-39. <https://doi.org/10.1083/jcb.200511054>.
- Alilain, Warren J., Kevin P. Horn, Hongmei Hu, Thomas E. Dick, et Jerry Silver. 2011. « Functional regeneration of respiratory pathways after spinal cord injury ». *Nature* 475 (7355): 196-200. <https://doi.org/10.1038/nature10199>.
- Amouri, Rim, Houda Nehdi, Yosr Bouhlal, Mounir Kefi, Abdelmajid Larnaout, et Fayçal Hentati. 2009. « Allelic ROBO3 Heterogeneity in Tunisian Patients with Horizontal Gaze Palsy with Progressive Scoliosis ». *Journal of Molecular Neuroscience* 39 (3): 337-41. <https://doi.org/10.1007/s12031-009-9217-4>.
- An, Sungwon, Rich Harang, Kirsten Meeker, Daniel Granados-Fuentes, Connie A. Tsai, Cristina Mazuski, Jihee Kim, Francis J. Doyle, Linda R. Petzold, et Erik D. Herzog. 2013. « A neuropeptide speeds circadian entrainment by reducing intercellular synchrony ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (46): E4355-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307088110>.
- Anderson, Mark A., Joshua E. Burda, Yilong Ren, Yan Ao, Timothy M. O'Shea, Riki Kawaguchi, Giovanni Coppola, Baljit S. Khakh, Timothy J. Deming, et Michael V. Sofroniew. 2016. « Astrocyte scar formation aids CNS axon regeneration ». *Nature* 532 (7598): 195-200. <https://doi.org/10.1038/nature17623>.
- Antonell, Anna, Albert Lladó, Jordi Altirriba, Teresa Botta-Orfila, Mircea Balasa, Manel Fernández, Isidre Ferrer, Raquel Sánchez-Valle, et José Luis Molinuevo. 2013. « A Preliminary Study of the Whole-Genome Expression Profile of Sporadic and Monogenic Early-Onset Alzheimer's Disease ». *Neurobiology of Aging* 34 (7): 1772-78. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.12.026>.
- Aranda, Marcos L., et Tiffany M. Schmidt. 2021. « Diversity of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: circuits and functions ». *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 78 (3): 889-907. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03641-5>.
- Athamneh, Ahmad I. M., et Daniel M. Suter. 2015. « Quantifying mechanical force in axonal growth and guidance ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9 (septembre): 359. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00359>.
- Attwell, Callan L., Mike van Zwieten, Joost Verhaagen, et Matthew R. J. Mason. 2018. « The Dorsal Column Lesion Model of Spinal Cord Injury and Its Use in Deciphering the Neuron-Intrinsic Injury Response ». *Developmental Neurobiology* 78 (10): 926-51. <https://doi.org/10.1002/dneu.22601>.
- Bagnard, Dominique, Marion Lohrum, Daniela Uziel, Andreas W. Püschel, et Jürgen Bolz. 1998. « Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections ». *Development* 125 (24): 5043-53. <https://doi.org/10.1242/dev.125.24.5043>.
- Bailey, Peter, David K. Chang, Katia Nones, Amber L. Johns, Ann-Marie Patch, Marie-Claude Gingras, David K. Miller, et al. 2016. « Genomic Analyses Identify Molecular Subtypes of Pancreatic Cancer ». *Nature* 531 (7592): 47-52. <https://doi.org/10.1038/nature16965>.

- Bandtlow, Christine E., Marc F. Schmidt, Tim D. Hassinger, Martin E. Schwab, et S. B. Kater. 1993. « Role of Intracellular Calcium in NI-35-Evoked Collapse of Neuronal Growth Cones ». *Science* 259 (5091): 80-83. <https://doi.org/10.1126/science.8418499>.
- Bareyre, Florence M., Natalie Garzorz, Claudia Lang, Thomas Misgeld, Hildegard Büning, et Martin Kerschensteiner. 2011. « In vivo imaging reveals a phase-specific role of STAT3 during central and peripheral nervous system axon regeneration ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (15): 6282-87. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015239108>.
- Barlow. 1965. « The mechanism of directionally selective units in rabbit's retina. - PMC ». 1965. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1357309/>.
- Barlow, H. B., R. M. Hill, et W. R. Levick. 1964. « Retinal ganglion cells responding selectively to direction and speed of image motion in the rabbit ». *The Journal of Physiology* 173 (3): 377-407.
- Barnes, Gregory, Ram S. Puranam, Yuling Luo, et James O. McNamara. 2003. « Temporal Specific Patterns of Semaphorin Gene Expression in Rat Brain after Kainic Acid-Induced Status Epilepticus ». *Hippocampus* 13 (1): 1-20. <https://doi.org/10.1002/hipo.10041>.
- Barnstable, C.J. 1984. « THY-1 ANTIGEN: A GANGLION CELL SPECIFIC MARKER IN RODENT RETINA ».
- Bassi, Daniel E., Haleh Mahloogi, et Andr♦s J. P. Klein-Szanto. 2000. « The Proprotein Convertases Furin and PACE4 Play a Significant Role in Tumor Progression ». *Molecular Carcinogenesis* 28 (2): 63-69. [https://doi.org/10.1002/1098-2744\(200006\)28:2<63::AID-MC1>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1098-2744(200006)28:2<63::AID-MC1>3.0.CO;2-C).
- Baudet, Marie-Laure, Krishna H Zivraj, Cei Abreu-Goodger, Alistair Muldal, Javier Armisen, Cherie Blenkinsop, Leonard D Goldstein, Eric A Miska, et Christine E Holt. 2011. « miR-124 acts through CoREST to control onset of Sema3A sensitivity in navigating retinal growth cones ». *Nature neuroscience* 15 (1): 29-38. <https://doi.org/10.1038/nn.2979>.
- Baver, Scott B., Galen E. Pickard, Patricia J. Sollars, et Gary E. Pickard. 2008. « Two Types of Melanopsin Retinal Ganglion Cell Differentially Innervate the Hypothalamic Suprachiasmatic Nucleus and the Olivary Pretectal Nucleus ». *European Journal of Neuroscience* 27 (7): 1763-70. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06149.x>.
- Bedell, Victoria M., Sang-Yeob Yeo, Kye Won Park, Jeffrey Chung, Pankaj Seth, Venkatesha Shivalingappa, Jinhua Zhao, et al. 2005. « roundabout4 is essential for angiogenesis in vivo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (18): 6373-78. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408318102>.
- Bei, Fengfeng, Henry Hing Cheong Lee, Xuefeng Liu, Georgia Gunner, Hai Jin, Long Ma, Chen Wang, et al. 2016. « Restoration of visual function by enhancing conduction in regenerated axons ». *Cell* 164 (1-2): 219-32. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.036>.
- Belin, Stephane, Homaira Nawabi, Chen Wang, Shaojun Tang, Alban Latremoliere, Peter Warren, Hubert Schorle, et al. 2015. « Injury-Induced Decline of Intrinsic Regenerative Ability Revealed by Quantitative Proteomics ». *Neuron* 86 (4): 1000-1014. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.060>.
- Ben-Sahra, Issam, Jessica J. Howell, John M. Asara, et Brendan D. Manning. 2013. « Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1 ». *Science (New York, N.Y.)* 339 (6125): 1323-28. <https://doi.org/10.1126/science.1228792>.
- Ben-Sahra, Issam, Gerta Hoxhaj, Stéphane J.H. Ricoult, John M. Asara, et Brendan D. Manning. 2016. « mTORC1 Induces Purine Synthesis Through Control of the Mitochondrial Tetrahydrofolate Cycle ». *Science (New York, N.Y.)* 351 (6274): 728-33. <https://doi.org/10.1126/science.aad0489>.
- Benson, M. Douglas, Mario I. Romero, Mark E. Lush, Q. Richard Lu, Mark Henkemeyer, et Luis F. Parada. 2005. « Ephrin-B3 is a myelin-based inhibitor of neurite outgrowth ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (30): 10694-99. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504021102>.

- Berghuis, Paul, Ann M. Rajnicek, Yury M. Morozov, Ruth A. Ross, Jan Mulder, Gabriella M. Urbán, Krisztina Monory, et al. 2007. « Hardwiring the Brain: Endocannabinoids Shape Neuronal Connectivity ». *Science* 316 (5828): 1212-16. <https://doi.org/10.1126/science.1137406>.
- Berson, David M., Ana Maria Castrucci, et Ignacio Provencio. 2010. « Morphology and mosaics of melanopsin-expressing retinal ganglion cell types in mice ». *The Journal of comparative neurology* 518 (13): 2405-22. <https://doi.org/10.1002/cne.22381>.
- Berson, David M., Felice A. Dunn, et Motoharu Takao. 2002. « Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock ». *Science* 295 (5557): 1070-73. <https://doi.org/10.1126/science.1067262>.
- Biankin, Andrew V., Nicola Waddell, Karin S. Kassahn, Marie-Claude Gingras, Lakshmi B. Muthuswamy, Amber L. Johns, David K. Miller, et al. 2012. « Pancreatic Cancer Genomes Reveal Aberrations in Axon Guidance Pathway Genes ». *Nature* 491 (7424): 399-405. <https://doi.org/10.1038/nature11547>.
- Bignami, A., et D. Dahl. 1974. « Astrocyte-Specific Protein and Radial Glia in the Cerebral Cortex of Newborn Rat ». *Nature* 252 (5478): 55-56. <https://doi.org/10.1038/252055a0>.
- Bignami, A., et Doris Dahl. 1976. « THE ASTROGLIAL RESPONSE TO STABBING. IMMUNOFLOUORESCENCE STUDIES WITH ANTIBODIES TO ASTROCYTE-SPECIFIC PROTEIN (GFA) IN MAMMALIAN AND SUBMAMMALIAN VERTEBRATES ». *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2 (2): 99-110. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1976.tb00488.x>.
- Binda, Elena, Alberto Visioli, Fabrizio Giani, Giuseppe Lamorte, Massimiliano Copetti, Ken L. Pitter, Jason T. Huse, et al. 2012. « The EphA2 Receptor Drives Self-Renewal and Tumorigenicity in Stem-like Tumor-Propagating Cells from Human Glioblastomas ». *Cancer Cell* 22 (6): 765-80. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.11.005>.
- Bisaz, Reto, Pere Boadas-Vaello, David Genoux, et Carmen Sandi. 2013. « Age-Related Cognitive Impairments in Mice with a Conditional Ablation of the Neural Cell Adhesion Molecule ». *Learning & Memory* 20 (4): 183-93. <https://doi.org/10.1101/lm.030064.112>.
- Blockus, Heike, et Alain Chédotal. 2016. « Slit-Robo Signaling ». *Development* 143 (17): 3037-44. <https://doi.org/10.1242/dev.132829>.
- Boilly, Benoni, Sam Faulkner, Phillip Jobling, et Hubert Hondermarck. 2017. « Nerve Dependence: From Regeneration to Cancer ». *Cancer Cell* 31 (3): 342-54. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.02.005>.
- Bonilla, Iris E., Katsuhisa Tanabe, et Stephen M. Strittmatter. 2002. « Small Proline-Rich Repeat Protein 1A Is Expressed by Axotomized Neurons and Promotes Axonal Outgrowth ». *The Journal of Neuroscience* 22 (4): 1303-15. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-04-01303.2002>.
- Bourikas, Dimitris, Vladimir Pekarik, Thomas Baeriswyl, Åsa Grunditz, Rejina Sadhu, Michele Nardó, et Esther T Stoeckli. 2005. « Sonic Hedgehog Guides Commissural Axons along the Longitudinal Axis of the Spinal Cord ». *Nature Neuroscience* 8 (3): 297-304. <https://doi.org/10.1038/nn1396>.
- Bouzioukh, Farima, Gaël Daoudal, Julien Falk, Dominique Debanne, Geneviève Rougon, et Valérie Castellani. 2006. « Semaphorin3A Regulates Synaptic Function of Differentiated Hippocampal Neurons ». *European Journal of Neuroscience* 23 (9): 2247-54. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04783.x>.
- Bouzioukh, Farima, George A. Wilkinson, Giselin Adelmann, Michael Frotscher, Valentin Stein, et Rüdiger Klein. 2007. « Tyrosine Phosphorylation Sites in ephrinB2 Are Required for Hippocampal Long-Term Potentiation But Not Long-Term Depression ». *The Journal of Neuroscience* 27 (42): 11279-88. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3393-07.2007>.
- Bradbury, Elizabeth J., et Emily R. Burnside. 2019. « Moving beyond the Glial Scar for Spinal Cord Repair ». *Nature Communications* 10 (1): 3879. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11707-7>.
- Bray, Eric R., Benjamin J. Yungher, Konstantin Levay, Marcio Ribeiro, Gennady Dvoryanchikov, Ana C. Ayupe, Kinjal Thakor, et al. 2019. « Thrombospondin-1 Mediates Axon Regeneration in

- Retinal Ganglion Cells ». *Neuron* 103 (4): 642-657.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.044>.
- Brinks, Henriette, Sabine Conrad, Johannes Vogt, Judit Oldekamp, Ana Sierra, Lutz Deitinghoff, Ingo Bechmann, et al. 2004. « The Repulsive Guidance Molecule RGMA Is Involved in the Formation of Afferent Connections in the Dentate Gyrus ». *The Journal of Neuroscience* 24 (15): 3862-69. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5296-03.2004>.
- Brittis, Perry A., David R. Canning, et Jerry Silver. 1992. « Chondroitin Sulfate as a Regulator of Neuronal Patterning in the Retina ». *Science* 255 (5045): 733-36.
<https://doi.org/10.1126/science.1738848>.
- Brose, K., K. S. Bland, K. H. Wang, D. Arnott, W. Henzel, C. S. Goodman, M. Tessier-Lavigne, et T. Kidd. 1999. « Slit Proteins Bind Robo Receptors and Have an Evolutionarily Conserved Role in Repulsive Axon Guidance ». *Cell* 96 (6): 795-806. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80590-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80590-5).
- Brown, Joshua M., Jiang Xia, BinQuan Zhuang, Kin-Sang Cho, Claude J. Rogers, Cristal I. Gama, Manish Rawat, et al. 2012. « A sulfated carbohydrate epitope inhibits axon regeneration after injury ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (13): 4768-73. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121318109>.
- Brown, Timothy M., Carlos Gias, Megumi Hatori, Sheena R. Keding, Ma'ayan Semo, Peter J. Coffey, John Gigg, Hugh D. Piggins, Satchidananda Panda, et Robert J. Lucas. 2010. « Melanopsin Contributions to Irradiance Coding in the Thalamo-Cortical Visual System ». *PLoS Biology* 8 (12): e1000558. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000558>.
- Bruce, Annadora J., Warren Boling, Mark S. Kindy, Jacques Peschon, Philipp J. Kraemer, Melissa K. Carpenter, Frederick W. Holtsberg, et Mark P. Mattson. 1996. « Altered Neuronal and Microglial Responses to Excitotoxic and Ischemic Brain Injury in Mice Lacking TNF Receptors ». *Nature Medicine* 2 (7): 788-94. <https://doi.org/10.1038/nm0796-788>.
- Bruce, Samantha Brown, Jonathan N. Smith, Peter G. Fuerst, et Lynda Erskine. 2017. « DSCAM promotes axon fasciculation and growth in the developing optic pathway ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (7): 1702-7.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1618606114>.
- Buhusi, Mona, Galina P. Demyanenko, Karry M. Jannie, Jasbir Dalal, Eli P. B. Darnell, Joshua A. Weiner, et Patricia F. Maness. 2009. « ALCAM Regulates Mediolateral Retinotopic Mapping in the Superior Colliculus ». *The Journal of Neuroscience* 29 (50): 15630-41.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2215-09.2009>.
- Bundesen, Liza Q., Tracy Aber Scheel, Barbara S. Bregman, et Lawrence F. Kromer. 2003. « Ephrin-B2 and EphB2 Regulation of Astrocyte-Meningeal Fibroblast Interactions in Response to Spinal Cord Lesions in Adult Rats ». *The Journal of Neuroscience* 23 (21): 7789-7800.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-21-07789.2003>.
- Bush, Toby G, Narman Puvanachandra, Catherine H Horner, Anabella Polito, Thor Ostefeld, Clive N Svendsen, Lennart Mucke, Martin H Johnson, et Michael V Sofroniew. 1999. « Leukocyte Infiltration, Neuronal Degeneration, and Neurite Outgrowth after Ablation of Scar-Forming, Reactive Astrocytes in Adult Transgenic Mice ». *Neuron* 23 (2): 297-308.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80781-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80781-3).
- Camp, Guy Van, Lieve Vits, Paul Coucke, Stanislas Lyonnet, Connie Schrandt-Stumpel, John Darby, Jeanette Holden, Arnold Munnich, et Patrick J. Willems. 1993. « A Duplication in the L1CAM Gene Associated with X-Linked Hydrocephalus ». *Nature Genetics* 4 (4): 421-25.
<https://doi.org/10.1038/ng0893-421>.
- Carmichael, S. Thomas, Ivonne Archibeque, Linslee Luke, Tim Nolan, Janneth Momiy, et Songlin Li. 2005. « Growth-Associated Gene Expression after Stroke: Evidence for a Growth-Promoting Region in Peri-Infarct Cortex ». *Experimental Neurology* 193 (2): 291-311.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.01.004>.

- Carr, Lauren, David B. Parkinson, et Xin-peng Dun. 2017. « Expression patterns of Slit and Robo family members in adult mouse spinal cord and peripheral nervous system ». *PLoS ONE* 12 (2): e0172736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172736>.
- Castellani, V., E. De Angelis, S. Kenwrick, et G. Rougon. 2002. « Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A ». *The EMBO Journal* 21 (23): 6348-57. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf645>.
- Castellani, Valérie, Alain Chédotal, Melitta Schachner, Catherine Faivre-Sarrailh, et Geneviève Rougon. 2000. « Analysis of the L1-Deficient Mouse Phenotype Reveals Cross-Talk between Sema3A and L1 Signaling Pathways in Axonal Guidance ». *Neuron* 27 (2): 237-49. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00033-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00033-7).
- Castro-Rivera, Emely, Sophia Ran, Philip Thorpe, et John D. Minna. 2004. « Semaphorin 3B (SEMA3B) Induces Apoptosis in Lung and Breast Cancer, Whereas VEGF165 Antagonizes This Effect ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (31): 11432-37. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403969101>.
- Cerpa, Waldo, Abigail Gambrill, Nibaldo C. Inestrosa, et Andres Barria. 2011. « Regulation of NMDA-Receptor Synaptic Transmission by Wnt Signaling ». *The Journal of Neuroscience* 31 (26): 9466-71. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6311-10.2011>.
- Cerpa, Waldo, Juan A. Godoy, Iván Alfaro, Ginny G. Fariás, María J. Metcalfe, Rodrigo Fuentealba, Christian Bonansco, et Nibaldo C. Inestrosa. 2008. « Wnt-7a Modulates the Synaptic Vesicle Cycle and Synaptic Transmission in Hippocampal Neurons ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (9): 5918-27. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705943200>.
- Chan, Carmen C. M., Clive R. Roberts, John D. Steeves, et Wolfram Tetzlaff. 2008. « Aggrecan Components Differentially Modulate Nerve Growth Factor-Responsive and Neurotrophin-3-Responsive Dorsal Root Ganglion Neurite Growth ». *Journal of Neuroscience Research* 86 (3): 581-92. <https://doi.org/10.1002/jnr.21522>.
- Chan, W-M, E I Traboulsi, B Arthur, N Friedman, C Andrews, et E C Engle. 2006. « Horizontal gaze palsy with progressive scoliosis can result from compound heterozygous mutations in ROBO3 ». *Journal of Medical Genetics* 43 (3): e11. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.035436>.
- Chang, Jianlan, Tian Lan, Changzheng Li, Xiaoqian Ji, Lingyun Zheng, Hongju Gou, Yitao Ou, et al. 2015. « Activation of Slit2-Robo1 Signaling Promotes Liver Fibrosis ». *Journal of Hepatology* 63 (6): 1413-20. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.07.033>.
- Charron, Frédéric, Elke Stein, Juhee Jeong, Andrew P McMahon, et Marc Tessier-Lavigne. 2003. « The Morphogen Sonic Hedgehog Is an Axonal Chemoattractant That Collaborates with Netrin-1 in Midline Axon Guidance ». *Cell* 113 (1): 11-23. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00199-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00199-5).
- Cheah, Menghon, Melissa R. Andrews, Daniel J. Chew, Elizabeth B. Moloney, Joost Verhaagen, Reinhard Fässler, et James W. Fawcett. 2016. « Expression of an Activated Integrin Promotes Long-Distance Sensory Axon Regeneration in the Spinal Cord ». *The Journal of Neuroscience* 36 (27): 7283-97. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0901-16.2016>.
- Chédotal, A., G. Kerjan, et C. Moreau-Fauvarque. 2005. « The Brain within the Tumor: New Roles for Axon Guidance Molecules in Cancers ». *Cell Death and Differentiation* 12 (8): 1044-56. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401707>.
- Chédotal, Alain. 2007. « Slits and Their Receptors ». In *Axon Growth and Guidance*, édité par Dominique Bagnard, 621:65-80. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-76715-4_5.
- Chen, Bing, Lauren Carr, et Xin-Peng Dun. 2019. « Dynamic expression of Slit1–3 and Robo1–2 in the mouse peripheral nervous system after injury ». *Neural Regeneration Research* 15 (5): 948-58. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.268930>.
- Chen, Jian, Hyun Joon Lee, Igor Jakovcevski, Ronak Shah, Neha Bhagat, Gabriele Loers, Hsing-Yin Liu, et al. 2010. « The Extracellular Matrix Glycoprotein Tenascin-C Is Beneficial for Spinal Cord Regeneration ». *Molecular Therapy* 18 (10): 1769-77. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.133>.

- Chen, Jing-Ying, Xiao-Xiao He, Chi Ma, Xin-Min Wu, Xi-Lin Wan, Zhen-Kai Xing, Qing-Qing Pei, et al. 2017. « Netrin-1 Promotes Glioma Growth by Activating NF-KB via UNC5A ». *Scientific Reports* 7 (1): 5454. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05707-0>.
- Chen, Maio S., Andrea B. Huber, Marjan E. van der Haar, Marcus Frank, Lisa Schnell, Adrian A. Spillmann, Franziska Christ, et Martin E. Schwab. 2000. « Nogo-A Is a Myelin-Associated Neurite Outgrowth Inhibitor and an Antigen for Monoclonal Antibody IN-1 ». *Nature* 403 (6768): 434-39. <https://doi.org/10.1038/35000219>.
- Chen, Peiwen, Xianhua Piao, et Paolo Bonaldo. 2015. « Role of Macrophages in Wallerian Degeneration and Axonal Regeneration after Peripheral Nerve Injury ». *Acta Neuropathologica* 130 (5): 605-18. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1482-4>.
- Chen, S.-K., T.C. Badea, et S. Hattar. 2011. « Photoentrainment and pupillary light reflex are mediated by distinct populations of ipRGCs ». *Nature* 476 (7358): 92-95. <https://doi.org/10.1038/nature10206>.
- Chen, Xiaolin, Jiankai Yang, Benjamin T. Kress, Jing Tong, Hai Liu, Takahiro Takano, Yuanli Zhao, Maiken Nedergaard, et Zeguano Ren. 2013. « Improved axonal regeneration after spinal cord injury in mice with astrocytic specific deletion of ephrin B2 ». *Neuroscience* 241 (juin): 89-99. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.03.010>.
- Chen, Zhe, Bryan B. Gore, Hua Long, Le Ma, et Marc Tessier-Lavigne. 2008. « Alternative Splicing of the Robo3 Axon Guidance Receptor Governs the Midline Switch from Attraction to Repulsion ». *Neuron* 58 (3): 325-32. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.02.016>.
- Cheng, Jin, Sadhna Sahani, Torben Johann Hausrat, Jenq-Wei Yang, Haichao Ji, Nikolai Schmarowski, Heiko Endle, et al. 2016. « Precise Somatotopic Thalamocortical Axon Guidance Depends on LPA-Mediated PRG-2/Radixin Signaling ». *Neuron* 92 (1): 126-42. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.035>.
- Chumley, Michael J., Timothy Catchpole, Robert E. Silvany, Steven G. Kernie, et Mark Henkemeyer. 2007. « EphB Receptors Regulate Stem/Progenitor Cell Proliferation, Migration, and Polarity during Hippocampal Neurogenesis ». *The Journal of Neuroscience* 27 (49): 13481-90. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4158-07.2007>.
- Cohen, N.R., J.S.H. Taylor, L.B. Scott, R.W. Guillery, P. Soriano, et A.J.W. Furley. 1998. « Errors in Corticospinal Axon Guidance in Mice Lacking the Neural Cell Adhesion Molecule L1 ». *Current Biology* 8 (1): 26-33. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70017-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70017-X).
- Colamarino, Sophia A., et Marc Tessier-Lavigne. 1995. « The Axonal Chemoattractant Netrin-1 Is Also a Chemorepellent for Trochlear Motor Axons ». *Cell* 81 (4): 621-29. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90083-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90083-7).
- Colwell, Christopher S., Stephan Michel, Jason Itri, Williams Rodriguez, J. Tam, Vincent Lelievre, Zhou Hu, X. Liu, et James A. Waschek. 2003. « Disrupted Circadian Rhythms in VIP- and PHI-Deficient Mice ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 285 (5): R939-49. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00200.2003>.
- Conceição, Raquel, Rachel S. Evans, Craig S. Pearson, Barbara Hännzi, Andrew Osborne, Sarita S. Deshpande, Keith R. Martin, et Amanda C. Barber. 2019. « Expression of Developmentally Important Axon Guidance Cues in the Adult Optic Chiasm ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 60 (14): 4727-39. <https://doi.org/10.1167/iovs.19-26732>.
- Crair, Michael C., et Carol A. Mason. 2016. « Reconnecting Eye to Brain ». *The Journal of Neuroscience* 36 (42): 10707-22. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1711-16.2016>.
- Cremer, H., G. Chazal, C. Goridis, et A. Represa. 1997. « NCAM Is Essential for Axonal Growth and Fasciculation in the Hippocampus ». *Molecular and Cellular Neurosciences* 8 (5): 323-35. <https://doi.org/10.1006/mcne.1996.0588>.
- Cremer, H., R. Lange, A. Christoph, M. Plomann, G. Vopper, J. Roes, R. Brown, S. Baldwin, P. Kraemer, et S. Scheff. 1994. « Inactivation of the N-CAM Gene in Mice Results in Size Reduction of the Olfactory Bulb and Deficits in Spatial Learning ». *Nature* 367 (6462): 455-59. <https://doi.org/10.1038/367455a0>.

- Cuitino, Loreto, Juan A. Godoy, Ginny G. Farías, Andrés Couve, Christian Bonansco, Marco Fuenzalida, et Nibaldo C. Inestrosa. 2010. « Wnt-5a Modulates Recycling of Functional GABAA Receptors on Hippocampal Neurons ». *The Journal of Neuroscience* 30 (25): 8411-20. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5736-09.2010>.
- Dahl, Doris. 1981. « The Vimentin-GFA Protein Transition in Rat Neuroglia Cytoskeleton Occurs at the Time of Myelination ». *Journal of Neuroscience Research* 6 (6): 741-48. <https://doi.org/10.1002/jnr.490060608>.
- Dai, Jinxia, Mona Buhusi, Galina P. Demyanenko, Leann H. Brennaman, Martin Hruska, Matthew B. Dalva, et Patricia F. Maness. 2013. « Neuron Glia-Related Cell Adhesion Molecule (NrCAM) Promotes Topographic Retinocollicular Mapping ». *PLoS ONE* 8 (9): e73000. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073000>.
- Dallol, Ashraf, Dion Morton, Eamonn R. Maher, et Farida Latif. 2003. « SLIT2 Axon Guidance Molecule Is Frequently Inactivated in Colorectal Cancer and Suppresses Growth of Colorectal Carcinoma Cells ». *Cancer Research* 63 (5): 1054-58.
- Dalva, Matthew B, Mari A Takasu, Michael Z Lin, Steven M Shamah, Linda Hu, Nicholas W Gale, et Michael E Greenberg. 2000. « EphB Receptors Interact with NMDA Receptors and Regulate Excitatory Synapse Formation ». *Cell* 103 (6): 945-56. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00197-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00197-5).
- Dang, C. V. 2013. « MYC, Metabolism, Cell Growth, and Tumorigenesis ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3 (8): a014217-a014217. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014217>.
- David, Samuel, et Albert J. Aguayo. 1981. « Axonal Elongation into Peripheral Nervous System "Bridges" after Central Nervous System Injury in Adult Rats ». *Science, New Series* 214 (4523): 931-33.
- Davies, Stephen J. A., Michael T. Fitch, Stacey P. Memberg, Alison K. Hall, Geoffrey Raisman, et Jerry Silver. 1997. « Regeneration of Adult Axons in White Matter Tracts of the Central Nervous System ». *Nature* 390 (6661): 680-83. <https://doi.org/10.1038/37776>.
- De La Torre, José R, Veit H Höpker, Guo-li Ming, Mu-ming Poo, Marc Tessier-Lavigne, Ali Hemmati-Brivanlou, et Christine E Holt. 1997. « Turning of Retinal Growth Cones in a Netrin-1 Gradient Mediated by the Netrin Receptor DCC ». *Neuron* 19 (6): 1211-24. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80413-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80413-4).
- De Wit, Joris, Fred De Winter, Jan Klooster, et Joost Verhaagen. 2005. « Semaphorin 3A Displays a Punctate Distribution on the Surface of Neuronal Cells and Interacts with Proteoglycans in the Extracellular Matrix ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 29 (1): 40-55. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.12.009>.
- DeBellard, Maria-Elena, Song Tang, Gitali Mukhopadhyay, Ying-Jing Shen, et Marie T. Filbin. 1996. « Myelin-Associated Glycoprotein Inhibits Axonal Regeneration from a Variety of Neurons via Interaction with a Sialoglycoprotein ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 7 (2): 89-101. <https://doi.org/10.1006/mcne.1996.0007>.
- Deiner, Michael S, Timothy E Kennedy, Amin Fazeli, Tito Serafini, Marc Tessier-Lavigne, et David W Sretavan. 1997. « Netrin-1 and DCC Mediate Axon Guidance Locally at the Optic Disc: Loss of Function Leads to Optic Nerve Hypoplasia ». *Neuron* 19 (3): 575-89. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80373-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80373-6).
- Delloye-Bourgeois, Céline, Elisabeth Brambilla, Marie-May Coissieux, Céline Guenebeaud, Rémy Pedoux, Virginie Firlej, Florence Cabon, Christian Brambilla, Patrick Mehlen, et Agnès Bernet. 2009. « Interference with Netrin-1 and Tumor Cell Death in Non-Small Cell Lung Cancer ». *Journal of the National Cancer Institute* 101 (4): 237-47. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn491>.
- Delloye-Bourgeois, Céline, Arnaud Jacquier, Camille Charoy, Florie Reynaud, Homaira Nawabi, Karine Thoinet, Karine Kindbeiter, et al. 2015. « PlexinA1 Is a New Slit Receptor and Mediates Axon Guidance Function of Slit C-Terminal Fragments ». *Nature Neuroscience* 18 (1): 36-45. <https://doi.org/10.1038/nn.3893>.

- Demyanenko, Galina P., et Patricia F. Maness. 2003. « The L1 Cell Adhesion Molecule Is Essential for Topographic Mapping of Retinal Axons ». *The Journal of Neuroscience* 23 (2): 530-38. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-02-00530.2003>.
- Demyanenko, Galina P., Vishwa Mohan, Xuying Zhang, Leann H. Brennaman, Katherine E.S. Dharbal, Tracy S. Tran, Paul B. Manis, et Patricia F. Maness. 2014. « Neural Cell Adhesion Molecule NrCAM Regulates Semaphorin 3F-Induced Dendritic Spine Remodeling ». *The Journal of Neuroscience* 34 (34): 11274-87. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1774-14.2014>.
- Depienne, C, M Cincotta, S Billot, D Bouteiller, S Groppa, V Brochard, C Flamand, et al. 2011. « A Novel DCC Mutation and Genetic Heterogeneity in Congenital Mirror Movements ».
- Dhande, Onkar S., Maureen E. Estevez, Lauren E. Quattrochi, Rana N. El-Danaf, Phong L. Nguyen, David M. Berson, et Andrew D. Huberman. 2013. « Genetic Dissection of Retinal Inputs to Brainstem Nuclei Controlling Image Stabilization ». *The Journal of Neuroscience* 33 (45): 17797-813. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2778-13.2013>.
- Dhande, Onkar S, et Andrew D Huberman. 2014. « Retinal ganglion cell maps in the brain: implications for visual processing ». *Current opinion in neurobiology* 24 (1): 133-42. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.08.006>.
- Dick, Gunnar, Chin Lik Tan, Joao Nuno Alves, Erich M. E. Ehlert, Gregory M. Miller, Linda C. Hsieh-Wilson, Kazuyuki Sugahara, et al. 2013. « Semaphorin 3A Binds to the Perineuronal Nets via Chondroitin Sulfate Type E Motifs in Rodent Brains ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (38): 27384-95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.310029>.
- Dityatev, Alexander, Galina Dityateva, Vladimir Sytnyk, Markus Delling, Nicolas Toni, Irina Nikonenko, Dominique Muller, et Melitta Schachner. 2004. « Polysialylated Neural Cell Adhesion Molecule Promotes Remodeling and Formation of Hippocampal Synapses ». *The Journal of Neuroscience* 24 (42): 9372-82. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1702-04.2004>.
- Duan, Xin, Mu Qiao, Fengfeng Bei, In-Jung Kim, Zhigang He, et Joshua R. Sanes. 2015. « SUBTYPE-SPECIFIC REGENERATION OF RETINAL GANGLION CELLS FOLLOWING AXOTOMY: EFFECTS OF OSTEOPOINTIN AND MTOR SIGNALING ». *Neuron* 85 (6): 1244-56. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.017>.
- Duffy, Philip, Xingxing Wang, Chad S. Siegel, Nathan Tu, Mark Henkemeyer, William B. J. Cafferty, et Stephen M. Strittmatter. 2012. « Myelin-derived ephrinB3 restricts axonal regeneration and recovery after adult CNS injury ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (13): 5063-68. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113953109>.
- Dun, Xin-peng, Lauren Carr, Patricia K. Woodley, Riordan W. Barry, Louisa K. Drake, Thomas Mindos, Sheridan L. Roberts, Alison C. Lloyd, et David B. Parkinson. 2019. « Macrophage-Derived Slit3 Controls Cell Migration and Axon Pathfinding in the Peripheral Nerve Bridge ». *Cell Reports* 26 (6): 1458-1472.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.081>.
- Dupraz, Sebastian, Brett J. Hilton, Andreas Husch, Telma E. Santos, Charlotte H. Coles, Sina Stern, Cord Brakebusch, et Frank Bradke. 2019. « RhoA Controls Axon Extension Independent of Specification in the Developing Brain ». *Current Biology* 29 (22): 3874-3886.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.040>.
- Ecker, Jennifer L., Olivia N. Dumitrescu, Kwoon Y. Wong, Nazia M. Alam, Shih-Kuo Chen, Tara LeGates, Jordan M. Renna, Glen T. Prusky, David M. Berson, et Samer Hattar. 2010. « Melanopsin-expressing retinal ganglion-cell photoreceptors: cellular diversity and role in pattern vision ». *Neuron* 67 (1): 49-60. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.05.023>.
- Edwards, Justin P., Xia Zhang, Kenneth A. Frauwirth, et David M. Mosser. 2006. « Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations ». *Journal of leukocyte biology* 80 (6): 1298-1307. <https://doi.org/10.1189/jlb.0406249>.
- Ellis, Erika M., Gregory Gauvain, Benjamin Sivyver, et Gabe J. Murphy. 2016. « Shared and distinct retinal input to the mouse superior colliculus and dorsal lateral geniculate nucleus ». *Journal of Neurophysiology* 116 (2): 602-10. <https://doi.org/10.1152/jn.00227.2016>.
- Erskine, Lynda, et Eloisa Herrera. 2014. « Connecting the Retina to the Brain ». *ASN NEURO* 6 (6): 1759091414562107. <https://doi.org/10.1177/1759091414562107>.

- Erskine, Lynda, Susan Reijntjes, Thomas Pratt, Laura Denti, Quenten Schwarz, Joaquim M. Vieira, Bennett Alakakone, Derryck Shewan, et Christiana Ruhrberg. 2011. « VEGF Signaling through Neuropilin 1 Guides Commissural Axon Crossing at the Optic Chiasm ». *Neuron* 70 (5): 951-65. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.052>.
- Erskine, Lynda, Scott E Williams, Katja Brose, Thomas Kidd, Rivka A Rachel, Corey S Goodman, Marc Tessier-Lavigne, et Carol A Mason. s. d. « Retinal Ganglion Cell Axon Guidance in the Mouse Optic Chiasm: Expression and Function of Robos and Slits », 8.
- Escalante, Augusto, Blanca Murillo, Cruz Morenilla-Palao, Avihs Klar, et Eloísa Herrera. 2013. « Zic2-Dependent Axon Midline Avoidance Controls the Formation of Major Ipsilateral Tracts in the CNS ». *Neuron* 80 (6): 1392-1406. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.007>.
- Essmann, Clara L, Elsa Martinez, Julia C Geiger, Manuel Zimmer, Matthias H Traut, Valentin Stein, Rüdiger Klein, et Amparo Acker-Palmer. 2008. « Serine Phosphorylation of EphrinB2 Regulates Trafficking of Synaptic AMPA Receptors ». *Nature Neuroscience* 11 (9): 1035-43. <https://doi.org/10.1038/nn.2171>.
- Estevez, Maureen E., P. Michelle Fogerson, Marissa C. Ilardi, Bart G. Borghuis, Eric Chan, Shijun Weng, Olivia N. Auferkorte, Jonathan B. Demb, et David M. Berson. 2012. « Form and Function of the M4 Cell, an Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cell Type Contributing to Geniculocortical Vision ». *The Journal of Neuroscience* 32 (39): 13608-20. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1422-12.2012>.
- Fabes, Jez, Patrick Anderson, Caroline Brennan, et Stephen Bolsover. 2007. « Regeneration-Enhancing Effects of EphA4 Blocking Peptide Following Corticospinal Tract Injury in Adult Rat Spinal Cord: EphA4 Blocking Peptide Evokes Corticospinal Tract Recovery ». *European Journal of Neuroscience* 26 (9): 2496-2505. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05859.x>.
- Fabes, Jez, Patrick Anderson, Rafael J. Yáñez-Muñoz, Adrian Thrasher, Caroline Brennan, et Stephen Bolsover. 2006. « Accumulation of the Inhibitory Receptor EphA4 May Prevent Regeneration of Corticospinal Tract Axons Following Lesion: EphA4 on CST Axons ». *European Journal of Neuroscience* 23 (7): 1721-30. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04704.x>.
- Fabre, Pierre J., Tomomi Shimogori, et Frédéric Charron. 2010. « Segregation of Ipsilateral Retinal Ganglion Cell Axons at the Optic Chiasm Requires the Shh Receptor Boc ». *The Journal of Neuroscience* 30 (1): 266-75. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3778-09.2010>.
- Falk, Julien, Ahmad Bechara, Roberto Fiore, Homaira Nawabi, Heather Zhou, Carolina Hoyo-Becerra, Muriel Bozon, et al. 2005. « Dual Functional Activity of Semaphorin 3B Is Required for Positioning the Anterior Commissure ». *Neuron* 48 (1): 63-75. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.08.033>.
- Fan, Yongfeng, Fanxia Shen, Yongmei Chen, Qi Hao, Weizhong Liu, Hua Su, William L Young, et Guo-Yuan Yang. 2008. « Overexpression of Netrin-1 Induces Neovascularization in the Adult Mouse Brain ». *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28 (9): 1543-51. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.39>.
- Farías, Ginny G., Iván E. Alfaro, Waldo Cerpa, Catalina P. Grabowski, Juan A. Godoy, Christian Bonansco, et Nibaldo C. Inestrosa. 2009. « Wnt-5a/JNK Signaling Promotes the Clustering of PSD-95 in Hippocampal Neurons ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (23): 15857-66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808986200>.
- Faulkner, Jill R., Julia E. Herrmann, Michael J. Woo, Keith E. Tansey, Ngan B. Doan, et Michael V. Sofroniew. 2004. « Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury ». *The Journal of Neuroscience* 24 (9): 2143-55. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3547-03.2004>.
- Fawcett, James W, et Richard. A Asher. 1999. « The Glial Scar and Central Nervous System Repair ». *Brain Research Bulletin* 49 (6): 377-91. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(99\)00072-6](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(99)00072-6).
- Feldheim, David A., Masaru Nakamoto, Miriam Osterfield, Nicholas W. Gale, Thomas M. DeChiara, Rajat Rohatgi, George D. Yancopoulos, et John G. Flanagan. 2004. « Loss-of-Function Analysis

- of EphA Receptors in Retinotectal Mapping ». *The Journal of Neuroscience* 24 (10): 2542-50. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0239-03.2004>.
- Fernandez, Diego Carlos, Yi-Ting Chang, Samer Hattar, et Shih-Kuo Chen. 2016. « Architecture of retinal projections to the central circadian pacemaker ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (21): 6047-52. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523629113>.
- Finney, Alexandra C., Steven D. Funk, Jonette M. Green, Arif Yurdagul, Mohammad Atif Rana, Rebecca Pistorius, Miriam Henry, et al. 2017. « EphA2 Expression Regulates Inflammation and Fibroproliferative Remodeling in Atherosclerosis ». *Circulation* 136 (6): 566-82. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026644>.
- Fitamant, Julien, Céline Guenebeaud, Marie-May Coissieux, Catherine Guix, Isabelle Treilleux, Jean-Yves Scoazec, Thomas Bachelot, Agnès Bernet, et Patrick Mehlen. 2008. « Netrin-1 Expression Confers a Selective Advantage for Tumor Cell Survival in Metastatic Breast Cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (12): 4850-55. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709810105>.
- Fontana, Adriano, Walter Fierz, et Hartmut Wekerle. 1984. « Astrocytes Present Myelin Basic Protein to Encephalitogenic T-Cell Lines ». *Nature* 307 (5948): 273-76. <https://doi.org/10.1038/307273a0>.
- 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>.
- Frischknecht, Renato, Martin Heine, David Perrais, Constanze I Seidenbecher, Daniel Choquet, et Eckart D Gundelfinger. 2009. « Brain Extracellular Matrix Affects AMPA Receptor Lateral Mobility and Short-Term Synaptic Plasticity ». *Nature Neuroscience* 12 (7): 897-904. <https://doi.org/10.1038/nn.2338>.
- Fung, Hon-Chung, Sonja Scholz, Mar Matarin, Javier Simón-Sánchez, Dena Hernandez, Angela Britton, J Raphael Gibbs, et al. 2006. « Genome-Wide Genotyping in Parkinson's Disease and Neurologically Normal Controls: First Stage Analysis and Public Release of Data ». *The Lancet Neurology* 5 (11): 911-16. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70578-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70578-6).
- Galatro, Thais F, Inge R Holtman, Antonio M Lerario, Ilia D Vainchtein, Nieske Brouwer, Paula R Sola, Mariana M Veras, et al. 2017. « Transcriptomic Analysis of Purified Human Cortical Microglia Reveals Age-Associated Changes ». *Nature Neuroscience* 20 (8): 1162-71. <https://doi.org/10.1038/nn.4597>.
- Gale, Nicholas W., Peter Baluk, Li Pan, Marilyn Kwan, Jocelyn Holash, Thomas M. DeChiara, Donald M. McDonald, et George D. Yancopoulos. 2001. « Ephrin-B2 Selectively Marks Arterial Vessels and Neovascularization Sites in the Adult, with Expression in Both Endothelial and Smooth-Muscle Cells ». *Developmental Biology* 230 (2): 151-60. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0112>.
- Gale, Samuel D., et Gabe J. Murphy. 2014. « Distinct Representation and Distribution of Visual Information by Specific Cell Types in Mouse Superficial Superior Colliculus ». *The Journal of Neuroscience* 34 (40): 13458-71. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2768-14.2014>.
- García-Álías, Guillermo, Stanley Barkhuysen, Miranda Buckle, et James W Fawcett. 2009. « Chondroitinase ABC Treatment Opens a Window of Opportunity for Task-Specific Rehabilitation ». *Nature Neuroscience* 12 (9): 1145-51. <https://doi.org/10.1038/nn.2377>.
- García-Frigola, Cristina, Maria Isabel Carreres, Celia Vegar, Carol Mason, et Eloísa Herrera. 2008. « Zic2 Promotes Axonal Divergence at the Optic Chiasm Midline by EphB1-Dependent and -Independent Mechanisms ». *Development* 135 (10): 1833-41. <https://doi.org/10.1242/dev.020693>.
- Gaub, Perrine, Yashashree Joshi, Anja Wuttke, Ulrike Naumann, Sven Schnichels, Peter Heiduschka, et Simone Di Giovanni. 2011. « The Histone Acetyltransferase P300 Promotes Intrinsic Axonal Regeneration ». *Brain* 134 (7): 2134-48. <https://doi.org/10.1093/brain/awr142>.

- Gekakis, Nicholas, David Staknis, Hubert B. Nguyen, Fred C. Davis, Lisa D. Wilsbacher, David P. King, Joseph S. Takahashi, et Charles J. Weitz. 1998. « Role of the CLOCK Protein in the Mammalian Circadian Mechanism ». *Science* 280 (5369): 1564-69. <https://doi.org/10.1126/science.280.5369.1564>.
- Giger, Roman J., Edmund R. Hollis, et Mark H. Tuszynski. 2010. « Guidance Molecules in Axon Regeneration ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (7): a001867. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001867>.
- Glasgow, Stephen D., Simon Labrecque, Ian V. Beamish, Sarah Aufmkolk, Julien Gibon, Dong Han, Stephanie N. Harris, et al. 2018. « Activity-Dependent Netrin-1 Secretion Drives Synaptic Insertion of GluA1-Containing AMPA Receptors in the Hippocampus ». *Cell Reports* 25 (1): 168-182.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.028>.
- Glasgow, Stephen D., Edwin W. Wong, Greta Thompson-Steckel, Nathalie Marcal, Philippe Séguéla, Edward S. Ruthazer, et Timothy E. Kennedy. 2020. « Pre- and post-synaptic roles for DCC in memory consolidation in the adult mouse hippocampus ». *Molecular Brain* 13 (avril): 56. <https://doi.org/10.1186/s13041-020-00597-2>.
- Godement, Pierre, Josselyne Salaün, et Michel Imbert. 1984. « Prenatal and Postnatal Development of Retinogeniculate and Retinocollicular Projections in the Mouse: DEVELOPMENT OF RETINAL PROJECTIONS IN MOUSE ». *Journal of Comparative Neurology* 230 (4): 552-75. <https://doi.org/10.1002/cne.902300406>.
- Goldberg, Jeffrey L., Matthew P. Klassen, Ying Hua, et Ben A. Barres. 2002. « Amacrine-Signaled Loss of Intrinsic Axon Growth Ability by Retinal Ganglion Cells ». *Science* 296 (5574): 1860-64. <https://doi.org/10.1126/science.1068428>.
- Goldman, Jennifer S., Mohammed A. Ashour, Margaret H. Magdesian, Nicolas X. Tritsch, Stephanie N. Harris, Nicolas Christofi, Raja Chemali, et al. 2013. « Netrin-1 Promotes Excitatory Synaptogenesis between Cortical Neurons by Initiating Synapse Assembly ». *The Journal of Neuroscience* 33 (44): 17278-89. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1085-13.2013>.
- Goldshmit, Yona, Mary P. Galea, Graham Wise, Perry F. Bartlett, et Ann M. Turnley. 2004. « Axonal Regeneration and Lack of Astrocytic Gliosis in EphA4-Deficient Mice ». *The Journal of Neuroscience* 24 (45): 10064-73. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2981-04.2004>.
- Good, Paul F., Daisy Alapat, Amy Hsu, Caryn Chu, Daniel Perl, Xiaping Wen, David E. Burstein, et D. Stave Kohtz. 2004. « A Role for Semaphorin 3A Signaling in the Degeneration of Hippocampal Neurons during Alzheimer's Disease ». *Journal of Neurochemistry* 91 (3): 716-36. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02766.x>.
- Gorla, Madhavi, Celine Santiago, Karina Chaudhari, Awo Akosua Kesewa Layman, Paula M. Oliver, et Greg J. Bashaw. 2019. « Ndfip Proteins Target Robo Receptors for Degradation and Allow Commissural Axons to Cross the Midline in the Developing Spinal Cord ». *Cell reports* 26 (12): 3298-3312.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.080>.
- Greenhalgh, Andrew D., et Samuel David. 2014. « Differences in the Phagocytic Response of Microglia and Peripheral Macrophages after Spinal Cord Injury and Its Effects on Cell Death ». *The Journal of Neuroscience* 34 (18): 6316-22. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4912-13.2014>.
- Griffin, Jarred M, et Frank Bradke. 2020. « Therapeutic repair for spinal cord injury: combinatory approaches to address a multifaceted problem ». *EMBO Molecular Medicine* 12 (3): e11505. <https://doi.org/10.15252/emmm.201911505>.
- Gu, Chenghua, Yutaka Yoshida, Jean Livet, Dorothy V. Reimert, Fanny Mann, Janna Merte, Christopher E. Henderson, Thomas M. Jessell, Alex L. Kolodkin, et David D. Ginty. 2005. « Semaphorin 3E and Plexin-D1 Control Vascular Pattern Independently of Neuropilins ». *Science* 307 (5707): 265-68. <https://doi.org/10.1126/science.1105416>.
- Guijarro-Muñoz, I., A.M. Cuesta, A. Alvarez-Cienfuegos, J.G. Geng, L. Alvarez-Vallina, et L. Sanz. 2012. « The Axonal Repellent Slit2 Inhibits Pericyte Migration: Potential Implications in Angiogenesis ». *Experimental Cell Research* 318 (4): 371-78. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.12.005>.

- Guy, Adam T, et Hiroyuki Kamiguchi. 2021. « Lipids as New Players in Axon Guidance and Circuit Development ». *Current Opinion in Neurobiology* 66 (février): 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.09.003>.
- Guy, Adam T., Yasuko Nagatsuka, Noriko Ooashi, Mariko Inoue, Asuka Nakata, Peter Greimel, Asuka Inoue, et al. 2015. « Glycerophospholipid Regulation of Modality-Specific Sensory Axon Guidance in the Spinal Cord ». *Science* 349 (6251): 974-77. <https://doi.org/10.1126/science.aab3516>.
- Hagino, Seita, Ken Iseki, Tetsuji Mori, Yuxiang Zhang, Tsuyoshi Hikake, Sachihiko Yokoya, Mayumi Takeuchi, Hiromi Hasimoto, Shinichi Kikuchi, et Akio Wanaka. 2003. « Slit and Glypican-1 MRNAs Are Coexpressed in the Reactive Astrocytes of the Injured Adult Brain ». *Glia* 42 (2): 130-38. <https://doi.org/10.1002/glia.10207>.
- Halfter, W. 1993. « A heparan sulfate proteoglycan in developing avian axonal tracts ». *The Journal of Neuroscience* 13 (7): 2863-73. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-07-02863.1993>.
- Hall, Anita C, Fiona R Lucas, et Patricia C Salinas. 2000. « Axonal Remodeling and Synaptic Differentiation in the Cerebellum Is Regulated by WNT-7a Signaling ». *Cell* 100 (5): 525-35. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80689-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80689-3).
- Harburg, Gwyndolen C., et Lindsay Hinck. 2011. « Navigating Breast Cancer: Axon Guidance Molecules as Breast Cancer Tumor Suppressors and Oncogenes ». *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 16 (3): 257-70. <https://doi.org/10.1007/s10911-011-9225-1>.
- Harvey, Alan R., et Delys R. Worthington. 1990. « The Projection from Different Visual Cortical Areas to the Rat Superior Colliculus ». *The Journal of Comparative Neurology* 298 (3): 281-92. <https://doi.org/10.1002/cne.902980303>.
- Hattar, S., MONICA KUMAR, ALEXANDER PARK, PATRICK TONG, JONATHAN TUNG, KING-WAI YAU, et DAVID M. BERSON. 2006. « Central Projections of Melanopsin-Expressing Retinal Ganglion Cells in the Mouse ». *The Journal of comparative neurology* 497 (3): 326-49. <https://doi.org/10.1002/cne.20970>.
- Hattar, S., H.-W. Liao, M. Takao, D. M. Berson, et K.-W. Yau. 2002. « Melanopsin-Containing Retinal Ganglion Cells: Architecture, Projections, and Intrinsic Photosensitivity ». *Science (New York, N.Y.)* 295 (5557): 1065-70. <https://doi.org/10.1126/science.1069609>.
- Hattori, Mitsuharu, Miriam Osterfield, et John G. Flanagan. 2000. « Regulated Cleavage of a Contact-Mediated Axon Repellent ». *Science, New Series* 289 (5483): 1360-65.
- He, Xiaosong, Yanqun Liu, Xiaohong Lin, Falei Yuan, Dahong Long, Zhijun Zhang, Yongting Wang, Aiguo Xuan, et Guo-Yuan Yang. 2018. « Netrin-1 attenuates brain injury after middle cerebral artery occlusion via downregulation of astrocyte activation in mice ». *Journal of Neuroinflammation* 15 (septembre): 268. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1291-5>.
- He, Zhigang, et Yishi Jin. 2016. « Intrinsic Control of Axon Regeneration ». *Neuron* 90 (3): 437-51. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.022>.
- He, Zhigang, et Marc Tessier-Lavigne. 1997. « Neuropilin Is a Receptor for the Axonal Chemorepellent Semaphorin III ». *Cell* 90 (4): 739-51. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80534-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80534-6).
- Hedgecock, Edward M., Joseph G. Culotti, et David H. Hall. 1990. « The Unc-5, Unc-6, and Unc-40 Genes Guide Circumferential Migrations of Pioneer Axons and Mesodermal Cells on the Epidermis in *C. Elegans* ». *Neuron* 4 (1): 61-85. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90444-K](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90444-K).
- Henkemeyer, Mark, Olga S. Itkis, Michelle Ngo, Peter W. Hickmott, et Iryna M. Ethell. 2003. « Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus ». *The Journal of Cell Biology* 163 (6): 1313-26. <https://doi.org/10.1083/jcb.200306033>.
- Herrera, Eloisa, Lucia Brown, Jun Aruga, Rivka A Rachel, Katsuhiko Mikoshiba, Stephen Brown, et Carol A Mason. 2003. « Zic2 Patterns Binocular Vision by Specifying the Uncrossed Retinal Projection ».
- Hindges, Robert, Todd McLaughlin, Nicolas Genoud, Mark Henkemeyer, et Dennis D.M O'Leary. 2002. « EphB Forward Signaling Controls Directional Branch Extension and Arborization Required

- for Dorsal-Ventral Retinotopic Mapping ». *Neuron* 35 (3): 475-87.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00799-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00799-7).
- Hollis, Edmund R., Nao Ishiko, Ting Yu, Chin-Chun Lu, Ariela Haimovich, Kristine Tolentino, Alisha Richman, et al. 2016. « Ryk controls remapping of motor cortex during functional recovery after spinal cord injury ». *Nature neuroscience* 19 (5): 697-705.
<https://doi.org/10.1038/nn.4282>.
- Holmes, S., A.-M. Downs, A. Fosberry, P. D. Hayes, D. Michalovich, P. Murdoch, K. Moores, et al. 2002. « Sema7A Is a Potent Monocyte Stimulator ». *Scandinavian Journal of Immunology* 56 (3): 270-75. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2002.01129.x>.
- Holtmaat, A. 2003. « Transient Downregulation of Sema3a Mrna in a Rat Model for Temporal Lobe Epilepsy A Novel Molecular Event Potentially Contributing to Mossy Fiber Sprouting ». *Experimental Neurology* 182 (1): 142-50. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00035-9).
- Holz, Marina K., Bryan A. Ballif, Steven P. Gygi, et John Blenis. 2005. « MTOR and S6K1 Mediate Assembly of the Translation Preinitiation Complex through Dynamic Protein Interchange and Ordered Phosphorylation Events ». *Cell* 123 (4): 569-80.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.024>.
- Hong, Kyonsoo, Lindsay Hinck, Makoto Nishiyama, Mu-ming Poo, Marc Tessier-Lavigne, et Elke 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>.
- Hu, Huaiyu. 2001. « Cell-Surface Heparan Sulfate Is Involved in the Repulsive Guidance Activities of Slit2 Protein ». *Nature Neuroscience* 4 (7): 695-701. <https://doi.org/10.1038/89482>.
- Hu, Ke, Lin Ji, Kathryn T. Applegate, Gaudenz Danuser, et Clare M. Waterman-Storer. 2007. « Differential Transmission of Actin Motion Within Focal Adhesions ». *Science* 315 (5808): 111-15. <https://doi.org/10.1126/science.1135085>.
- Huber, Andrea B., Oliver Weinmann, Christian Brösamle, Thomas Oertle, et Martin E. Schwab. 2002. « Patterns of Nogo mRNA and Protein Expression in the Developing and Adult Rat and After CNS Lesions ». *The Journal of Neuroscience* 22 (9): 3553-67.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-09-03553.2002>.
- Huberman, Andrew D., Mihai Manu, Selina Koch, Michael W. Susman, Amanda Brosius Lutz, Erik M. Ullian, Stephen A. Baccus, et Ben A. Barres. 2008. « Architecture and activity-mediated refinement of axonal projections from a mosaic of genetically identified retinal ganglion cells ». *Neuron* 59 (3): 425-38. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.07.018>.
- Huberman, Andrew D., Karl D Murray, David K Warland, David A Feldheim, et Barbara Chapman. 2005. « Ephrin-As mediate targeting of eye-specific projections to the lateral geniculate nucleus ». *Nature neuroscience* 8 (8): 1013-21. <https://doi.org/10.1038/nn1505>.
- Huberman, Andrew D., Wei Wei, Justin Elstrott, Ben K. Stafford, Marla B. Feller, et Ben A. Barres. 2009. « Genetic Identification of an On-Off Direction-Selective Retinal Ganglion Cell Subtype Reveals a Layer-Specific Subcortical Map of Posterior Motion ». *Neuron* 62 (3): 327-34.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.04.014>.
- Huebner, Eric A., et Stephen M. Strittmatter. 2009. « Axon Regeneration in the Peripheral and Central Nervous Systems ». *Results and problems in cell differentiation* 48: 339-51.
https://doi.org/10.1007/400_2009_19.
- Huyghe, Aurélie, Giacomo Furlan, Duygu Ozmadenci, Christina Galonska, Jocelyn Charlton, Xavier Gaume, Noémie Combémoré, et al. 2020. « Netrin-1 Promotes Naive Pluripotency through Neo1 and Unc5b Co-Regulation of Wnt and MAPK Signalling ». *Nature Cell Biology* 22 (4): 389-400. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0483-2>.

- Ichijo, Hiroyuki, et Izumi Kawabata. 2001. « Roles of the Telencephalic Cells and their Chondroitin Sulfate Proteoglycans in Delimiting an Anterior Border of the Retinal Pathway ». *The Journal of Neuroscience* 21 (23): 9304-14. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-23-09304.2001>.
- Inatani, Masaru, Fumitoshi Irie, Andrew S. Plump, Marc Tessier-Lavigne, et Yu Yamaguchi. 2003. « Mammalian Brain Morphogenesis and Midline Axon Guidance Require Heparan Sulfate ». *Science* 302 (5647): 1044-46. <https://doi.org/10.1126/science.1090497>.
- Inestrosa, Nibaldo C., et Ernest Arenas. 2010. « Emerging Roles of Wnts in the Adult Nervous System ». *Nature Reviews Neuroscience* 11 (2): 77-86. <https://doi.org/10.1038/nrn2755>.
- Isaksen, Toke Jost, Yuki Fujita, et Toshihide Yamashita. 2020. « Repulsive Guidance Molecule A Suppresses Adult Neurogenesis ». *Stem Cell Reports* 14 (4): 677-91. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.03.003>.
- Ishii, Naoaki, G Wadsworth, Brian D Stern, Joseph G Culotti, et Edward M Hedgecock. 1992. « UNC-6, a Laminin-Related Protein, Guides Cell and Pioneer Axon Migrations in *C. Elegans* ».
- Ito, Shinya, et David A. Feldheim. 2018. « The Mouse Superior Colliculus: An Emerging Model for Studying Circuit Formation and Function ». *Frontiers in Neural Circuits* 12 (février): 10. <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00010>.
- Jacinto, Estela, Robbie Loewith, Anja Schmidt, Shuo Lin, Markus A. Rüegg, Alan Hall, et Michael N. Hall. 2004. « Mammalian TOR Complex 2 Controls the Actin Cytoskeleton and Is Rapamycin Insensitive ». *Nature Cell Biology* 6 (11): 1122-28. <https://doi.org/10.1038/ncb1183>.
- Jankowski, Michael P., Pamela K. Cornuet, Sabrina Mcllwraith, H. Richard Koerber, et Kathryn M. Albers. 2006. « SRY-Box Containing Gene 11 (Sox11) Transcription Factor Is Required for Neuron Survival and Neurite Growth ». *Neuroscience* 143 (2): 501-14. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.09.010>.
- Jankowski, Michael P., Sabrina L. Mcllwraith, Xiaotang Jing, Pamela K. Cornuet, Kathleen M. Salerno, H. Richard Koerber, et Kathryn M. Albers. 2009. « Sox11 transcription factor modulates peripheral nerve regeneration in adult mice ». *Brain research* 1256 (février): 43-54. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.12.032>.
- Jaubert-Miazza, Lisa, Erick Green, Fu-Sun Lo, Kim Bui, Jeremy Mills, et William Guido. 2005. « Structural and Functional Composition of the Developing Retinogeniculate Pathway in the Mouse ». *Visual Neuroscience* 22 (5): 661-76. <https://doi.org/10.1017/S0952523805225154>.
- Je, Eun Mi, Min Gwak, Hyerim Oh, Mi Ryoung Choi, Youn Jin Choi, Sug Hyung Lee, et Nam Jin Yoo. 2013. « Frameshift Mutations of Axon Guidance Genes ROBO1 and ROBO2 in Gastric and Colorectal Cancers with Microsatellite Instability ». *Pathology* 45 (7): 645-50. <https://doi.org/10.1097/PAT.0000000000000007>.
- Jeroen Pasterkamp, R., Jacques J. Peschon, Melanie K. Spriggs, et Alex L. Kolodkin. 2003. « Semaphorin 7A Promotes Axon Outgrowth through Integrins and MAPKs ». *Nature* 424 (6947): 398-405. <https://doi.org/10.1038/nature01790>.
- Ji, Jong-Dae, Kyung-Hyun Park-Min, et Lionel B. Ivashkiv. 2009. « Expression and Function of Semaphorin 3A and Its Receptors in Human Monocyte-derived Macrophages ». *Human immunology* 70 (4): 211-17. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.01.026>.
- Jin, Duo, Yuanyuan Liu, Fang Sun, Xuhua Wang, Xuefeng Liu, et Zhigang He. 2015. « Restoration of Skilled Locomotion by Sprouting Corticospinal Axons Induced by Co-Deletion of PTEN and SOCS3 ». *Nature Communications* 6 (1): 8074. <https://doi.org/10.1038/ncomms9074>.
- Jones, Leonard L, Richard U Margolis, et Mark H Tuszynski. 2003. « The Chondroitin Sulfate Proteoglycans Neurocan, Brevican, Phosphacan, and Versican Are Differentially Regulated Following Spinal Cord Injury ». *Experimental Neurology* 182 (2): 399-411. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00087-6](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00087-6).
- Juriscic, Giorgia, Hélène Maby-El Hajjami, Sinem Karaman, Alexandra M. Ochsenein, Annamari Alitalo, Shoib S. Siddiqui, Carlos Ochoa Pereira, Tatiana V. Petrova, et Michael Detmar. 2012. « An unexpected role of semaphorin3A/neuropilin-1 signaling in lymphatic vessel maturation and valve formation ». *Circulation research* 111 (4): 426-36. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.269399>.

- Kaneko, Shinjiro, Akio Iwanami, Masaya Nakamura, Akiyoshi Kishino, Kaoru Kikuchi, Shinsuke Shibata, Hirota J Okano, et al. 2006. « A Selective Sema3A Inhibitor Enhances Regenerative Responses and Functional Recovery of the Injured Spinal Cord ». *Nature Medicine* 12 (12): 1380-89. <https://doi.org/10.1038/nm1505>.
- Kay, Jeremy N., Irina De la Huerta, In-Jung Kim, Yifeng Zhang, Masahito Yamagata, Monica W. Chu, Markus Meister, et Joshua R. Sanes. 2011. « Retinal Ganglion Cells with Distinct Directional Preferences Differ in Molecular Identity, Structure, and Central Projections ». *The Journal of Neuroscience* 31 (21): 7753-62. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0907-11.2011>.
- Kayser, Matthew S., Andrew C. McClelland, Ethan G. Hughes, et Matthew B. Dalva. 2006. « Intracellular and Trans-Synaptic Regulation of Glutamatergic Synaptogenesis by EphB Receptors ». *The Journal of Neuroscience* 26 (47): 12152-64. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3072-06.2006>.
- Keirstead, Hans S., Joel M. Levine, et William F. Blakemore. 1998. « Response of the Oligodendrocyte Progenitor Cell Population (Defined by NG2 Labelling) to Demyelination of the Adult Spinal Cord ». *Glia* 22 (2): 161-70. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199802\)22:2<161::AID-GLIA7>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199802)22:2<161::AID-GLIA7>3.0.CO;2-A).
- Keleman, Krystyna, Srikanth Rajagopalan, Diana Cleppien, David Teis, Karin Paiha, Lukas A. Huber, Gerhard M. Technau, et Barry J. Dickson. 2002. « Comm Sorts Robo to Control Axon Guidance at the Drosophila Midline ». *Cell* 110 (4): 415-27. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00901-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00901-7).
- Keleman, Krystyna, Carlos Ribeiro, et Barry J Dickson. 2005. « Comm Function in Commissural Axon Guidance: Cell-Autonomous Sorting of Robo in Vivo ». *Nature Neuroscience* 8 (2): 156-63. <https://doi.org/10.1038/nn1388>.
- Kelm, Sørge, Andrea Pelz, Roland Schauer, Marie T. Filbin, Song Tang, Maria-Elena de Bellard, Ronald L. Schnaar, et al. 1994. « Sialoadhesin, Myelin-Associated Glycoprotein and CD22 Define a New Family of Sialic Acid-Dependent Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Superfamily ». *Current Biology* 4 (11): 965-72. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00220-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00220-7).
- Kennedy, Timothy E., Tito Serafini, JoséR. De La Torre, et Marc Tessier-Lavigne. 1994. « Netrins Are Diffusible Chemotropic Factors for Commissural Axons in the Embryonic Spinal Cord ». *Cell* 78 (3): 425-35. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90421-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90421-9).
- Kerschensteiner, Daniel, et William Guido. 2017. « Organization of the Dorsal Lateral Geniculate Nucleus in the Mouse ». *Visual Neuroscience* 34: E008. <https://doi.org/10.1017/S0952523817000062>.
- 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).
- Kidd, Thomas, Katja Brose, Kevin J Mitchell, Richard D Fetter, Marc Tessier-Lavigne, Corey S Goodman, et Guy Tear. 1998. « Roundabout Controls Axon Crossing of the CNS Midline and Defines a Novel Subfamily of Evolutionarily Conserved Guidance Receptors ». *Cell* 92 (2): 205-15. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80915-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80915-0).
- Kim, In-Jung, Yifeng Zhang, Markus Meister, et Joshua R. Sanes. 2010. « Laminar Restriction of Retinal Ganglion Cell Dendrites and Axons: Subtype-Specific Developmental Patterns Revealed with Transgenic Markers ». *The Journal of Neuroscience* 30 (4): 1452-62. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4779-09.2010>.
- Kitayama, Mari, Masaki Ueno, Toru Itakura, et Toshihide Yamashita. 2011. « Activated Microglia Inhibit Axonal Growth through RGMa ». *PLoS ONE* 6 (9): e25234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025234>.
- Klein, Rüdiger. 2009. « Bidirectional Modulation of Synaptic Functions by Eph/Ephrin Signaling ». *Nature Neuroscience* 12 (1): 15-20. <https://doi.org/10.1038/nn.2231>.

- Knöll, Bernd, Christine Weinl, Alfred Nordheim, et Friedrich Bonhoeffer. 2007. « Stripe Assay to Examine Axonal Guidance and Cell Migration ». *Nature Protocols* 2 (5): 1216-24. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.157>.
- Kolodkin, Alex L, Dorothy V Levengood, Erica G Rowe, Yu-Tzu Tai, Roman J Giger, et David D Ginty. 1997. « Neuropilin Is a Semaphorin III Receptor ». *Cell* 90 (4): 753-62. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80535-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80535-8).
- Koser, David E., Amelia J. Thompson, Sarah K. Foster, Asha Dwivedy, Eva K. Pillai, Graham K. Sheridan, Hanno Svoboda, et al. 2016. « Mechanosensing is critical for axon growth in the developing brain ». *Nature neuroscience* 19 (12): 1592-98. <https://doi.org/10.1038/nn.4394>.
- Kottis, Vicky, Pierre Thibault, Daniel Mikol, Zhi-Cheng Xiao, Rulin Zhang, Pauline Dergham, et Peter E. Braun. 2002. « Oligodendrocyte-Myelin Glycoprotein (OMgp) Is an Inhibitor of Neurite Outgrowth: OMgp Is an Inhibitor of Neurite Outgrowth ». *Journal of Neurochemistry* 82 (6): 1566-69. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01146.x>.
- Krahe, Thomas E., Rana N. El-Danaf, Emily K. Dilger, Scott C. Henderson, et William Guido. 2011. « Morphologically Distinct Classes of Relay Cells Exhibit Regional Preferences in the Dorsal Lateral Geniculate Nucleus of the Mouse ». *The Journal of Neuroscience* 31 (48): 17437-48. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4370-11.2011>.
- Kullander, Klas, Susan D. Croll, Manuel Zimmer, Li Pan, Joyce McClain, Virginia Hughes, Stephanie Zabski, et al. 2001. « Ephrin-B3 is the midline barrier that prevents corticospinal tract axons from recrossing, allowing for unilateral motor control ». *Genes & Development* 15 (7): 877-88. <https://doi.org/10.1101/gad.868901>.
- Kumanogoh, Atsushi, Satoko Marukawa, Kazuhiro Suzuki, Noriko Takegahara, Chie Watanabe, EweSeng Ch'ng, Isao Ishida, et al. 2002. « Class IV Semaphorin Sema4A Enhances T-Cell Activation and Interacts with Tim-2 ». *Nature* 419 (6907): 629-33. <https://doi.org/10.1038/nature01037>.
- Kumanogoh, Atsushi, Chie Watanabe, Ihnsook Lee, Xiaosong Wang, Wei Shi, Hiroshi Araki, Haruhiko Hirata, et al. 2000. « Identification of CD72 as a Lymphocyte Receptor for the Class IV Semaphorin CD100: A Novel Mechanism for Regulating B Cell Signaling ». *Nature* 403 (6827): 41-45. <https://doi.org/10.1038/35001>.
- Kume, Kazuhiko, Mark J Zylka, Sathyanarayanan Sriram, Lauren P Shearman, David R Weaver, Xiaowei Jin, Elizabeth S Maywood, Michael H Hastings, et Steven M Reppert. 1999. « MCRY1 and MCRY2 Are Essential Components of the Negative Limb of the Circadian Clock Feedback Loop ». *Cell* 98 (2): 193-205. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81014-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81014-4).
- Kunda, Patricia, Gabriela Paglini, Santiago Quiroga, Kenneth Kosik, et Alfredo Cáceres. 2001. « Evidence for the Involvement of Tiam1 in Axon Formation ». *The Journal of Neuroscience* 21 (7): 2361-72. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-07-02361.2001>.
- Kurimoto, Takuji, Yuqin Yin, Kumiko Omura, Hui-ya Gilbert, Daniel Kim, Ling-Ping Cen, Lilamarie Moko, Sebastian Kügler, et Larry I. Benowitz. 2010. « Long-Distance Axon Regeneration in the Mature Optic Nerve: Contributions of Oncomodulin, cAMP, and pten Gene Deletion ». *The Journal of Neuroscience* 30 (46): 15654-63. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4340-10.2010>.
- Kury, Patrick, Daniel Abankwa, Fabian Kruse, Regine Greiner-Petter, et Hans Werner Muller. 2004. « Gene Expression Profiling Reveals Multiple Novel Intrinsic and Extrinsic Factors Associated with Axonal Regeneration Failure ». *European Journal of Neuroscience* 19 (1): 32-42. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03112.x>.
- Kuwajima, Takaaki, Célia A. Soares, Austen A. Sitko, Véronique Lefebvre, et Carol Mason. 2017. « SoxC transcription factors promote contralateral retinal ganglion cell differentiation and axon guidance in the mouse visual system ». *Neuron* 93 (5): 1110-1125.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.029>.
- Kuwajima, Takaaki, Yutaka Yoshida, Noriko Takegahara, Timothy J. Petros, Atsushi Kumanogoh, Thomas M. Jessell, Takeshi Sakurai, et Carol Mason. 2012. « Optic chiasm presentation of Semaphorin6D in the context of Plexin-A1 and Nr-CAM promotes retinal axon midline crossing ». *Neuron* 74 (4): 676-90. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.025>.

- Lämmermann, Tim, et Michael Sixt. 2009. « Mechanical Modes of 'Amoeboid' Cell Migration ». *Current Opinion in Cell Biology* 21 (5): 636-44. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.05.003>.
- Leaver, S G, Q Cui, G W Plant, A Arulpragasam, S Hisheh, J Verhaagen, et A R Harvey. 2006. « AAV-Mediated Expression of CNTF Promotes Long-Term Survival and Regeneration of Adult Rat Retinal Ganglion Cells ». *Gene Therapy* 13 (18): 1328-41. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302791>.
- Lee, Jae K., Renee Chow, Fang Xie, Sharon Y. Chow, Kristine E. Tolentino, et Binhai Zheng. 2010. « Combined Genetic Attenuation of Myelin and Semaphorin-Mediated Growth Inhibition Is Insufficient to Promote Serotonergic Axon Regeneration ». *The Journal of Neuroscience* 30 (32): 10899-904. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2269-10.2010>.
- Lee, Menq-Jer, James R Van Brocklyn, Shobha Thangada, Catherine H Liu, Arthur R Hand, Ramil Menzeleev, Sarah Spiegel, et Timothy Hla. 1998. « +Sphingosine-1-Phosphate As a Ligand for the G Protein-Coupled Receptor EDG-1 ». *The Journal of Neuroscience* 18 (10): 3937-47.
- Lee, Ramee, Timothy J. Petros, et Carol A. Mason. 2008. « Zic2 Regulates Retinal Ganglion Cell Axon Avoidance of ephrinB2 through Inducing Expression of the Guidance Receptor EphB1 ». *The Journal of Neuroscience* 28 (23): 5910-19. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0632-08.2008>.
- Lee, Won Suk, Won-Ha Lee, Yong Chul Bae, et Kyoungsoo Suk. 2019. « Axon Guidance Molecules Guiding Neuroinflammation ». *Experimental Neurobiology* 28 (3): 311-19. <https://doi.org/10.5607/en.2019.28.3.311>.
- Lejmi, Esma, Ilyes Bouras, Serge Camelo, Marie Roumieux, Norbert Minet, Carole Leré-Déan, Tatyana Merkulova-Rainon, et al. 2014. « Netrin-4 promotes mural cell adhesion and recruitment to endothelial cells ». *Vascular Cell* 6 (janvier): 1. <https://doi.org/10.1186/2045-824X-6-1>.
- Lesnick, Timothy G, Spiridon Papapetropoulos, Deborah C Mash, Jarlath Ffrench-Mullen, Lina Shehadeh, Mariza de Andrade, John R Henley, Walter A Rocca, J. Eric Ahlskog, et Demetrius M Maraganore. 2007. « A Genomic Pathway Approach to a Complex Disease: Axon Guidance and Parkinson Disease ». *PLoS Genetics* 3 (6): e98. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030098>.
- Lewandowski, Gail, et Oswald Steward. 2014. « AAVshRNA-Mediated Suppression of PTEN in Adult Rats in Combination with Salmon Fibrin Administration Enables Regenerative Growth of Corticospinal Axons and Enhances Recovery of Voluntary Motor Function after Cervical Spinal Cord Injury ». *The Journal of Neuroscience* 34 (30): 9951-62. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1996-14.2014>.
- Li, Vivian S. W., Siu Tsan Yuen, Tsun Leung Chan, Helen H. N. Yan, Wai Lun Law, Bonnie H. Y. Yeung, Annie S. Y. Chan, et al. 2009. « Frequent Inactivation of Axon Guidance Molecule RGMA in Human Colon Cancer through Genetic and Epigenetic Mechanisms ». *Gastroenterology* 137 (1): 176-87. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.03.005>.
- Li, Yi, Ying Chen, Ling Tan, Jing-Ying Pan, Wei-Wei Lin, Jian Wu, Wen Hu, Xue Chen, et Xiao-Dong Wang. 2017. « RNAi-mediated ephrin-B2 silencing attenuates astroglial-fibrotic scar formation and improves spinal cord axon growth ». *CNS Neuroscience & Therapeutics* 23 (10): 779-89. <https://doi.org/10.1111/cns.12723>.
- Li, Yi, et Michael Chopp. 1999. « Temporal Profile of Nestin Expression after Focal Cerebral Ischemia in Adult Rat ». *Brain Research* 838 (1-2): 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01502-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01502-4).
- Lim, Jung-Hwan A., Benjamin K. Stafford, Phong L. Nguyen, Brian V. Lien, Chen Wang, Katherine Zukor, Zhigang He, et Andrew D. Huberman. 2016. « Neural activity promotes long distance, target-specific regeneration of adult retinal axons ». *Nature neuroscience* 19 (8): 1073-84. <https://doi.org/10.1038/nn.4340>.
- Lima, Silmara de, Yoshiaki Koriyama, Takuji Kurimoto, Julia Teixeira Oliveira, Yuqin Yin, Yiqing Li, Hui-Ya Gilbert, Michela Fagiolini, Ana Maria Blanco Martinez, et Larry Benowitz. 2012. « Full-length axon regeneration in the adult mouse optic nerve and partial recovery of simple visual behaviors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (23): 9149-54. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119449109>.

- Lindenmaier, L Bailey, Nicolas Parmentier, Caiying Guo, Fadel Tissir, et Kevin M Wright. 2019. « Dystroglycan is a scaffold for extracellular axon guidance decisions ». *eLife* 8: e42143. <https://doi.org/10.7554/eLife.42143>.
- Lindskog, Henrik, Yung Hae Kim, Eric B. Jelin, Yupeng Kong, Salvador Guevara-Gallardo, Tyson N. Kim, et Rong A. Wang. 2014. « Molecular identification of venous progenitors in the dorsal aorta reveals an aortic origin for the cardinal vein in mammals ». *Development (Cambridge, England)* 141 (5): 1120-28. <https://doi.org/10.1242/dev.101808>.
- Liu, Kai, Yi Lu, Jae K. Lee, Ramsey Samara, Rafer Willenberg, Ilse Sears-Kraxberger, Andrea Tedeschi, et al. 2010. « PTEN Deletion Enhances the Regenerative Ability of Adult Corticospinal Neurons ». *Nature neuroscience* 13 (9): 1075-81. <https://doi.org/10.1038/nn.2603>.
- Liu, Yaobo, Jun Shi, Chin-Chun Lu, Zheng-Bei Wang, Anna I Lyuksyutova, Xue-Jun Song, et Yimin Zou. 2005. « Ryk-Mediated Wnt Repulsion Regulates Posterior-Directed Growth of Corticospinal Tract ». *Nature Neuroscience* 8 (9): 1151-59. <https://doi.org/10.1038/nn1520>.
- Liu, Yaobo, Xiaofei Wang, Chin-Chun Lu, Rachel Sherman-Kermen, Oswald Steward, Xiao-Ming Xu, et Yimin Zou. 2008. « Repulsive Wnt Signaling Inhibits Axon Regeneration after CNS Injury ». *The Journal of Neuroscience* 28 (33): 8376-82. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1939-08.2008>.
- Lloyd, Amy F., Claire L. Davies, Rebecca K. Holloway, Yasmine Labrak, Graeme Ireland, Dario Carradori, Alessandra Dillenburg, et al. 2019. « Central Nervous System Regeneration Is Driven by Microglia Necroptosis and Repopulation ». *Nature Neuroscience* 22 (7): 1046-52. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0418-z>.
- Logan, Ann, Sally A. Frautschy, Ana-Maria Gonzalez, Michael B. Sporn, et Andrew Baird. 1992. « Enhanced expression of transforming growth factor β 1 in the rat brain after a localized cerebral injury ». *Brain research* 587 (2): 216-25.
- London, Nyall R., et Dean Y. Li. 2011. « Robo4-dependent Slit signaling stabilizes the vasculature during pathologic angiogenesis and cytokine storm ». *Current opinion in hematology* 18 (3): 186-90. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e328345a4b9>.
- Löw, Karin, Maya Culbertson, Frank Bradke, Marc Tessier-Lavigne, et Mark H. Tuszynski. 2008. « Netrin-1 Is a Novel Myelin-Associated Inhibitor to Axon Growth ». *The Journal of Neuroscience* 28 (5): 1099-1108. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4906-07.2008>.
- Lu, Xiaowei, Ferdinand Le Noble, Li Yuan, Quingjan Jiang, Benjamin De Lafarge, Daisuke Sugiyama, Christiane Bréant, et al. 2004. « The Netrin Receptor UNC5B Mediates Guidance Events Controlling Morphogenesis of the Vascular System ». *Nature* 432 (7014): 179-86. <https://doi.org/10.1038/nature03080>.
- Luchino, Jonathan, Mélanie Hocine, Marie-Claude Amoureux, Benjamin Gibert, Agnès Bernet, Amélie Royet, Isabelle Treilleux, et al. 2013. « Semaphorin 3E Suppresses Tumor Cell Death Triggered by the Plexin D1 Dependence Receptor in Metastatic Breast Cancers ». *Cancer Cell* 24 (5): 673-85. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.09.010>.
- Luo, Xueting, Yadira Salgueiro, Samuel R. Beckerman, Vance P. Lemmon, Pantelis Tsoulfas, et Kevin K. Park. 2013. « Three-dimensional evaluation of retinal ganglion cell axon regeneration and pathfinding in whole mouse tissue after injury ». *Experimental neurology* 247 (septembre): 653-62. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.03.001>.
- Luo, Yuling, David Raible, et Jonathan A. Raper. 1993. « Collapsin: A Protein in Brain That Induces the Collapse and Paralysis of Neuronal Growth Cones ». *Cell* 75 (2): 217-27. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80064-L](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80064-L).
- Ly, Alice, Anatoly Nikolaev, Geetha Suresh, Yufang Zheng, Marc Tessier-Lavigne, et Elke Stein. 2008. « DSCAM is a netrin receptor that collaborates with DCC in mediating turning responses to netrin-1 ». *Cell* 133 (7): 1241-54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.030>.
- Lyuksyutova, Anna I., Chin-Chun Lu, Nancy Milanesio, Leslie A. King, Nini Guo, Yanshu Wang, Jeremy Nathans, Marc Tessier-Lavigne, et Yimin Zou. 2003. « Anterior-Posterior Guidance of Commissural Axons by Wnt-Frizzled Signaling ». *Science* 302 (5652): 1984-88. <https://doi.org/10.1126/science.1089610>.

- Maceyka, Michael, Kuzhuvelil B. Harikumar, Sheldon Milstien, et Sarah Spiegel. 2012. « SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE SIGNALING AND ITS ROLE IN DISEASE ». *Trends in Cell Biology* 22 (1): 50-60. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.003>.
- Manitt, Colleen, Michael A. Colicos, Katherine M. Thompson, Etienne Rousselle, Alan C. Peterson, et Timothy E. Kennedy. 2001. « Widespread Expression of Netrin-1 by Neurons and Oligodendrocytes in the Adult Mammalian Spinal Cord ». *The Journal of Neuroscience* 21 (11): 3911-22. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-11-03911.2001>.
- Manitt, Colleen, David Wang, Timothy E. Kennedy, et Dena R. Howland. 2006. « Positioned to Inhibit: Netrin-1 and Netrin Receptor Expression after Spinal Cord Injury ». *Journal of Neuroscience Research* 84 (8): 1808-20. <https://doi.org/10.1002/jnr.21070>.
- Maraganore, Demetrius M., Mariza de Andrade, Timothy G. Lesnick, Kari J. Strain, Matthew J. Farrer, Walter A. Rocca, P. V. Krishna Pant, Kelly A. Frazer, David R. Cox, et Dennis G. Ballinger. 2005. « High-Resolution Whole-Genome Association Study of Parkinson Disease ». *American Journal of Human Genetics* 77 (5): 685-93.
- Marcos, Séverine, Francisco Nieto-Lopez, Africa Sandonìs, Marcos Julian Cardozo, Fabiana Di Marco, Pilar Esteve, et Paola Bovolenta. 2015. « Secreted Frizzled Related Proteins Modulate Pathfinding and Fasciculation of Mouse Retina Ganglion Cell Axons by Direct and Indirect Mechanisms ». *The Journal of Neuroscience* 35 (11): 4729-40. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3304-13.2015>.
- Marston, Daniel J., Sarah Dickinson, et Catherine D. Nobes. 2003. « Rac-Dependent Trans-Endocytosis of EphrinBs Regulates Eph–Ephrin Contact Repulsion ». *Nature Cell Biology* 5 (10): 879-88. <https://doi.org/10.1038/ncb1044>.
- Matsumoto, Yoshihiro, Fumitoshi Irie, Masaru Inatani, Marc Tessier-Lavigne, et Yu Yamaguchi. 2007. « Netrin-1/DCC Signaling in Commissural Axon Guidance Requires Cell-Autonomous Expression of Heparan Sulfate ». *The Journal of Neuroscience* 27 (16): 4342-50. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0700-07.2007>.
- May, Paul J. 2006. « The Mammalian Superior Colliculus: Laminar Structure and Connections ». In *Progress in Brain Research*, 151:321-78. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(05\)51011-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(05)51011-2).
- Mazelin, Laetitia, Agnès Bernet, Christelle Bonod-Bidaud, Laurent Pays, Ségolène Arnaud, Christian Gispach, Dale E. Bredesen, Jean-Yves Scoazec, et Patrick Mehlen. 2004. « Netrin-1 Controls Colorectal Tumorigenesis by Regulating Apoptosis ». *Nature* 431 (7004): 80-84. <https://doi.org/10.1038/nature02788>.
- Mckee, Robert J., Ahmet Höke, et Jerry Silver. 1995. « Injury-Induced Proteoglycans Inhibit the Potential for Laminin-Mediated Axon Growth on Astrocytic Scars ». *Experimental Neurology* 136 (1): 32-43. <https://doi.org/10.1006/exnr.1995.1081>.
- McNeill, David S, Catherine J Sheely, Jennifer L Ecker, Tudor C Badea, Duncan Morhardt, William Guido, et Samer Hattar. 2011. « Development of melanopsin-based irradiance detecting circuitry ». *Neural Development* 6 (mars): 8. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-6-8>.
- McQuarrie, I. G., et B. Grafstein. 1973. « Axon Outgrowth Enhanced by a Previous Nerve Injury ». *Archives of Neurology* 29 (1): 53-55. <https://doi.org/10.1001/archneur.1973.00490250071008>.
- Merrill, J.E. 1991. « Effects of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor- α on Astrocytes, Microglia, Oligodendrocytes, and Glial Precursors in Vitro ». *Developmental Neuroscience* 13 (3): 130-37. <https://doi.org/10.1159/000112150>.
- Mieda, Michihiro, Daisuke Ono, Emi Hasegawa, Hitoshi Okamoto, Ken-ichi Honma, Sato Honma, et Takeshi Sakurai. 2015. « Cellular Clocks in AVP Neurons of the SCN Are Critical for Interneuronal Coupling Regulating Circadian Behavior Rhythm ». *Neuron* 85 (5): 1103-16. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.005>.
- Mikol and Stefansson. 1988. « A phosphatidylinositol-linked peanut agglutinin-binding glycoprotein in central nervous system myelin and on oligodendrocytes ». *The Journal of Cell Biology* 106 (4): 1273-79.

- Ming, Guo-li, Hong-jun Song, Benedikt Berninger, Christine E Holt, Marc Tessier-Lavigne, et Mu-ming Poo. 1997. « CAMP-Dependent Growth Cone Guidance by Netrin-1 ». *Neuron* 19 (6): 1225-35. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80414-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80414-6).
- Moore, Darcie L., Murray G. Blackmore, Ying Hu, Klaus H. Kaestner, John L. Bixby, Vance P. Lemmon, et Jeffrey L. Goldberg. 2009. « KLF Family Members Regulate Intrinsic Axon Regeneration Ability ». *Science (New York, N.Y.)* 326 (5950): 298-301. <https://doi.org/10.1126/science.1175737>.
- Moore, Robert Y. 2013. « The Suprachiasmatic Nucleus and the Circadian Timing System ». In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 119:1-28. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396971-2.00001-4>.
- Moore, Robert Y., Joan C. Speh, et J. Patrick Card. 1995. « The Retinohypothalamic Tract Originates from a Distinct Subset of Retinal Ganglion Cells ». *The Journal of Comparative Neurology* 352 (3): 351-66. <https://doi.org/10.1002/cne.903520304>.
- Moreau-Fauvarque, Caroline, Atsushi Kumanogoh, Emeline Camand, Céline Jaillard, Gilles Barbin, Isabelle Boquet, Christopher Love, et al. 2003. « The Transmembrane Semaphorin Sema4D/CD100, an Inhibitor of Axonal Growth, Is Expressed on Oligodendrocytes and Upregulated after CNS Lesion ». *The Journal of Neuroscience* 23 (27): 9229-39. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-27-09229.2003>.
- Morenilla-Palao, Cruz, María Teresa López-Cascales, José P. López-Atalaya, Diana Baeza, Luís Calvo-Díaz, Angel Barco, et Eloísa Herrera. 2020. « A Zic2-regulated switch in a noncanonical Wnt/ β catenin pathway is essential for the formation of bilateral circuits ». *Science Advances* 6 (46): eaaz8797. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz8797>.
- Morgenstern, Daniel A., Richard A. Asher, et James W. Fawcett. 2002. « Chapter 22 Chondroitin Sulphate Proteoglycans in the CNS Injury Response ». In *Progress in Brain Research*, 137:313-32. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(02\)37024-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(02)37024-9).
- Mothe, Andrea J., Nardos G. Tassew, Alireza P. Shabanzadeh, Romeo Penheiro, Robin J. Vigouroux, Lili Huang, Christine Grinnell, et al. 2017. « RGMa inhibition with human monoclonal antibodies promotes regeneration, plasticity and repair, and attenuates neuropathic pain after spinal cord injury ». *Scientific Reports* 7 (septembre): 10529. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10987-7>.
- Müller, Adrienne, Thomas G. Hauk, Marco Leibinger, Ralf Marienfeld, et Dietmar Fischer. 2009. « Exogenous CNTF Stimulates Axon Regeneration of Retinal Ganglion Cells Partially via Endogenous CNTF ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 41 (2): 233-46. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.03.002>.
- Murcia-Belmonte, Verónica, Yaiza Coca, Celia Vegar, Santiago Negueruela, Camino de Juan Romero, Arturo José Valiño, Salvador Sala, et al. 2019. « A Retino-retinal Projection Guided by Unc5c Emerged in Species with Retinal Waves ». *Current Biology* 29 (7): 1149-1160.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.02.052>.
- Nakagawa, Shinichi, Caroline Brennan, Karl G. Johnson, Derryck Shewan, William A. Harris, et Christine E. Holt. 2000. « Ephrin-B Regulates the Ipsilateral Routing of Retinal Axons at the Optic Chiasm ». *Neuron* 25 (3): 599-610. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81063-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81063-6).
- Nakashiba, Toshiaki, Toshio Ikeda, Sachiko Nishimura, Kei Tashiro, Tasuku Honjo, Joseph G. Culotti, et Shigeyoshi Itohara. 2000. « Netrin-G1: a Novel Glycosyl Phosphatidylinositol-Linked Mammalian Netrin That Is Functionally Divergent from Classical Netrins ». *The Journal of Neuroscience* 20 (17): 6540-50. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-17-06540.2000>.
- Nakayama, Hironao, Sarah Bruneau, Nora Kochupurakkal, Silvia Coma, David M. Briscoe, et Michael Klagsbrun. 2015. « Regulation of mTOR Signaling by Semaphorin 3F-Neuropilin 2 Interactions In Vitro and In Vivo ». *Scientific Reports* 5 (juillet): 11789. <https://doi.org/10.1038/srep11789>.
- Nawabi, Homaira, Anne Briançon-Marjollet, Christopher Clark, Isabelle Sanyas, Hyota Takamatsu, Tatsusada Okuno, Atsushi Kumanogoh, et al. 2010. « A midline switch of receptor processing regulates commissural axon guidance in vertebrates ». *Genes & Development* 24 (4): 396-410. <https://doi.org/10.1101/gad.542510>.

- Nawabi, Homaira, et Valérie Castellani. 2011. « Axonal Commissures in the Central Nervous System: How to Cross the Midline? » *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 68 (15): 2539-53. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0691-9>.
- Neumann, Simona, et Clifford J Woolf. 1999. « Regeneration of Dorsal Column Fibers into and beyond the Lesion Site Following Adult Spinal Cord Injury ». *Neuron* 23 (1): 83-91. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80755-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80755-2).
- Niclou, Simone P., Li Jia, et Jonathan A. Raper. 2000. « Slit2 Is a Repellent for Retinal Ganglion Cell Axons ». *The Journal of Neuroscience* 20 (13): 4962-74. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-13-04962.2000>.
- Nishino, Akiko, Michiyasu Suzuki, Haruo Ohtani, Osamu Motohashi, Kunihiko Umezawa, Hiroshi Nagura, et Takashi Yoshimoto. 1993. « Thrombin May Contribute to the Pathophysiology of Central Nervous System Injury ». *Journal of Neurotrauma* 10 (2): 167-79. <https://doi.org/10.1089/neu.1993.10.167>.
- Nörenberg, Ursel, Michael Hubert, et Fritz G. Rathjen. 1996. « STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF TENASCIN-R (RESTRICTIN), AN EXTRACELLULAR MATRIX GLYCOPROTEIN OF GLIAL CELLS AND NEURONS ». *International Journal of Developmental Neuroscience* 14 (3): 217-31. [https://doi.org/10.1016/0736-5748\(96\)00009-3](https://doi.org/10.1016/0736-5748(96)00009-3).
- Norsworthy, Michael, Fengfeng Bei, Riki Kawaguchi, Qing Wang, Nicholas Tran, Benedikt Brommer, Yiming Zhang, et al. 2017. « Sox11 Expression Promotes Regeneration of Some Retinal Ganglion Cell Types but Kills Others ». *Neuron* 94 (6): 1112-1120.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.035>.
- Ogata-Iwao, Minako, Masaru Inatani, Keiichiro Iwao, Yuji Takihara, Yuko Nakaishi-Fukuchi, Fumitoshi Irie, Shigeru Sato, Takahisa Furukawa, Yu Yamaguchi, et Hidenobu Tanihara. 2011. « Heparan Sulfate Regulates Intraretinal Axon Pathfinding by Retinal Ganglion Cells ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52 (9): 6671-79. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7559>.
- Okuno, Tatsusada, Yuji Nakatsuji, et Atsushi Kumanogoh. 2011. « The Role of Immune Semaphorins in Multiple Sclerosis ». *FEBS Letters* 585 (23): 3829-35. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.03.033>.
- O'Leary, Conor J., DanaKai Bradford, Min Chen, Amanda White, Daniel G. Blackmore, et Helen M. Cooper. 2015. « The Netrin/RGM Receptor, Neogenin, Controls Adult Neurogenesis by Promoting Neuroblast Migration and Cell Cycle Exit ». *Stem Cells* 33 (2): 503-14. <https://doi.org/10.1002/stem.1861>.
- Onishi, Keisuke, et Yimin Zou. 2017. « Sonic Hedgehog switches on Wnt/planar cell polarity signaling in commissural axon growth cones by reducing levels of Shisa2 ». *eLife* 6: e25269. <https://doi.org/10.7554/eLife.25269>.
- Ordan, Elly, et Talila Volk. 2016. « Amontillado is required for Drosophila Slit processing and for tendon-mediated muscle patterning ». *Biology Open* 5 (10): 1530-34. <https://doi.org/10.1242/bio.020636>.
- Oster, Stephen F., MacDara O. Bodeker, Fengling He, et David W. Sretavan. 2003. « Invariant Sema5A Inhibition Serves an Ensheathing Function during Optic Nerve Development ». *Development* 130 (4): 775-84. <https://doi.org/10.1242/dev.00299>.
- Oyster, C. W. 1968. « The analysis of image motion by the rabbit retina ». *The Journal of Physiology* 199 (3): 613-35.
- Oyster, Clyde W., et Horace B. Barlow. 1967. « Direction-Selective Units in Rabbit Retina: Distribution of Preferred Directions ». *Science* 155 (3764): 841-42. <https://doi.org/10.1126/science.155.3764.841>.
- Pang, Ji-Jie, Fan Gao, et Samuel M. Wu. 2003. « Light-Evoked Excitatory and Inhibitory Synaptic Inputs to ON and OFF α Ganglion Cells in the Mouse Retina ». *The Journal of Neuroscience* 23 (14): 6063-73. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-14-06063.2003>.
- Papapetropoulos, Spiridon, Jarlath FFrench-Mullen, Donald McCorquodale, Yujing Qin, John Pablo, et Deborah C. Mash. 2018. « Multiregional Gene Expression Profiling Identifies MRPS6 as a Possible Candidate Gene for Parkinson's Disease ». *Gene Expression* 13 (3): 205-15.

- Park, Kevin Kyungsuk, Kai Liu, Yang Hu, Patrice D. Smith, Chen Wang, Bin Cai, Bengang Xu, et al. 2008. « Promoting Axon Regeneration in the Adult CNS by Modulation of the PTEN/mTOR Pathway ». *Science (New York, N.Y.)* 322 (5903): 963-66. <https://doi.org/10.1126/science.1161566>.
- Parra, Liseth M, et Yimin Zou. 2010. « Sonic Hedgehog Induces Response of Commissural Axons to Semaphorin Repulsion during Midline Crossing ». *Nature Neuroscience* 13 (1): 29-35. <https://doi.org/10.1038/nn.2457>.
- Parrinello, Simona, Ilaria Napoli, Sara Ribeiro, Patrick Wingfield Digby, Marina Fedorova, David B. Parkinson, Robin D.S. Doddrell, Masanori Nakayama, Ralf H. Adams, et Alison C. Lloyd. 2010. « EphB Signaling Directs Peripheral Nerve Regeneration through Sox2-Dependent Schwann Cell Sorting ». *Cell* 143 (1): 10.1016/j.cell.2010.08.039. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.039>.
- Pasquale, Elena B. 2005. « Eph Receptor Signalling Casts a Wide Net on Cell Behaviour ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (6): 462-75. <https://doi.org/10.1038/nrm1662>.
- Pasterkamp, R Jeroen, Sharon M Kolk, Anita JCGM Hellemons, et Alex L Kolodkin. 2007. « Expression patterns of semaphorin7A and plexinC1 during rat neural development suggest roles in axon guidance and neuronal migration ». *BMC Developmental Biology* 7 (août): 98. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-98>.
- Pasterkamp, R.J., R.J. Giger, M-J. Ruitenber, A.J.G.D. Holtmaat, J. De Wit, F. De Winter, et J. Verhaagen. 1999. « Expression of the Gene Encoding the Chemorepellent Semaphorin III Is Induced in the Fibroblast Component of Neural Scar Tissue Formed Following Injuries of Adult But Not Neonatal CNS ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 13 (2): 143-66. <https://doi.org/10.1006/mcne.1999.0738>.
- Pasternack, J. M., C. R. Abraham, B. J. Van Dyke, H. Potter, et S. G. Younkin. 1989. « Astrocytes in Alzheimer's disease gray matter express alpha 1-antichymotrypsin mRNA. » *The American Journal of Pathology* 135 (5): 827-34.
- Peng, Jimmy, Pierre J. Fabre, Tiphaine Dolique, Shannon M. Swikert, Laëticia Kermasson, Tomomi Shimogori, et Frédéric Charron. 2018. « Sonic Hedgehog Is a Remotely Produced Cue That Controls Axon Guidance Trans-Axonally at a Midline Choice Point ». *Neuron* 97 (2): 326-340.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.028>.
- Pernet, V, S Joly, N Jordi, D Dalkara, A Guzik-Kornacka, J G Flannery, et M E Schwab. 2013. « Misguidance and modulation of axonal regeneration by Stat3 and Rho/ROCK signaling in the transparent optic nerve ». *Cell Death & Disease* 4 (7): e734. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.266>.
- Pernet, Vincent, et Martin E. Schwab. 2014. « Lost in the Jungle: New Hurdles for Optic Nerve Axon Regeneration ». *Trends in Neurosciences* 37 (7): 381-87. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.05.002>.
- Perry, V. H., et M. C. Brown. 1992. « Role of Macrophages in Peripheral Nerve Degeneration and Repair ». *BioEssays* 14 (6): 401-6. <https://doi.org/10.1002/bies.950140610>.
- Petratos, Steven, Qiao-Xin Li, Ameer J. George, Xu Hou, Megan L. Kerr, Sharon E. Unabia, Irene Hatzinisiriou, Danuta Maksel, Marie-Isabel Aguilar, et David H. Small. 2008. « The β -Amyloid Protein of Alzheimer's Disease Increases Neuronal CRMP-2 Phosphorylation by a Rho-GTP Mechanism ». *Brain* 131 (1): 90-108. <https://doi.org/10.1093/brain/awm260>.
- Pfeiffenberger, Cory, Tyler Cutforth, Georgia Woods, Jena Yamada, Rene' C. Rentería, David R. Copenhagen, John G. Flanagan, et David A. Feldheim. 2005. « Ephrin-As and neural activity are required for eye-specific patterning during retinogeniculate mapping ». *Nature neuroscience* 8 (8): 1022-27. <https://doi.org/10.1038/nn1508>.
- Pickard, Gary E. 1985. « BIFURCATING AXONS OF RETINAL GANGLION CELLS TERMINATE IN THE HYPOTHALAMIC SUPRACHIASMATIC NUCLEUS AND THE INTERGENICULATE LEAFLET OF THE THALAMUS ».
- Pignata, Aurora, Hugo Ducuing, Leila Boubakar, Thibault Gardette, Karine Kindbeiter, Muriel Bozon, Servane Tauszig-Delamasure, Julien Falk, Olivier Thoumine, et Valérie Castellani. 2019. « A

- Spatiotemporal Sequence of Sensitization to Slits and Semaphorins Orchestrates Commissural Axon Navigation ». *Cell Reports* 29 (2): 347-362.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.098>.
- Pires-Neto, M.A., S. Braga-de-Souza, et R. Lent. 1999. « Extracellular Matrix Molecules Play Diverse Roles in the Growth and Guidance of Central Nervous System Axons ». *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32 (5): 633-38. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1999000500017>.
- Plachez, Céline, William Andrews, Anastasia Liapi, Bernd Knoell, Uwe Drescher, Baljinder Mankoo, Liu Zhe, et al. 2008. « Robos Are Required for the Correct Targeting of Retinal Ganglion Cell Axons in the Visual Pathway of the Brain ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 37 (4): 719-30. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.12.017>.
- Plant, Tracie, Suttida Eamsamrng, Manuel A. Sanchez-Garcia, Leila Reyes, Stephen A. Renshaw, Patricia Coelho, Ananda S. Mirchandani, et al. 2020. « Semaphorin 3F signaling actively retains neutrophils at sites of inflammation ». *The Journal of Clinical Investigation* 130 (6): 3221-37. <https://doi.org/10.1172/JCI130834>.
- 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).
- Podjaski, Cornelia, Jorge I. Alvarez, Lyne Bourbonniere, Sandra Larouche, Simone Terouz, Jenea M. Bin, Marc-André Lécuyer, et al. 2015. « Netrin 1 regulates blood–brain barrier function and neuroinflammation ». *Brain* 138 (6): 1598-1612. <https://doi.org/10.1093/brain/awv092>.
- Porstmann, Thomas, Claudio R. Santos, Beatrice Griffiths, Megan Cully, Mary Wu, Sally Leivers, John R. Griffiths, Yuen-Li Chung, et Almut Schulze. 2008. « SREBP Activity Is Regulated by mTORC1 and Contributes to Akt-Dependent Cell Growth ». *Cell Metabolism* 8 (3-3): 224-36. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.07.007>.
- Prasad, Anil, Vikram Paruchuri, Anju Preet, Farida Latif, et Ramesh K. Ganju. 2008. « Slit-2 Induces a Tumor-Suppressive Effect by Regulating Beta-Catenin in Breast Cancer Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (39): 26624-33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800679200>.
- Provencio, Ignacio, Mark D. Rollag, et Ana Maria Castrucci. 2002. « Photoreceptive Net in the Mammalian Retina ». *Nature* 415 (6871): 493-493. <https://doi.org/10.1038/415493a>.
- Purohit, Anish A., Weiquan Li, Chao Qu, Trisha Dwyer, Qiangqiang Shao, Kun-Liang Guan, et Guofa Liu. 2012. « Down Syndrome Cell Adhesion Molecule (DSCAM) Associates with Uncoordinated-5C (UNC5C) in Netrin-1-mediated Growth Cone Collapse ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (32): 27126-38. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.340174>.
- Rajagopalan, Srikanth, Emmanuelle Nicolas, et Barry J Dickson. 2000. « Selecting a Longitudinal Pathway: Robo Receptors Specify the Lateral Position of Axons in the Drosophila CNS ». *Neuron* 25 (3): 671-82.
- Reza, Julie Naima, Isabella Gavazzi, et James Cohen. 1999. « Neuropilin-1 Is Expressed on Adult Mammalian Dorsal Root Ganglion Neurons and Mediates Semaphorin3a/Collapsin-1-Induced Growth Cone Collapse by Small Diameter Sensory Afferents ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 14 (4-5): 317-26. <https://doi.org/10.1006/mcne.1999.0786>.
- Rheume, Bruce A., Amyeo Jereen, Mohan Bolisetty, Muhammad S. Sajid, Yue Yang, Kathleen Renna, Lili Sun, Paul Robson, et Ephraim F. Trakhtenberg. 2018. « Single cell transcriptome profiling of retinal ganglion cells identifies cellular subtypes ». *Nature Communications* 9 (juillet): 2759. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05134-3>.
- Ricard, Jerome, Jessica Salinas, Lissette Garcia, et Daniel J. Liebl. 2006. « EphrinB3 Regulates Cell Proliferation and Survival in Adult Neurogenesis ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 31 (4): 713-22. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.01.002>.
- Rivlin-Etzion, Michal, Kaili Zhou, Wei Wei, Justin Elstrott, Phong L. Nguyen, Ben A. Barres, Andrew D. Huberman, et Marla B. Feller. 2011. « Transgenic Mice Reveal Unexpected Diversity of On-Off Direction-Selective Retinal Ganglion Cell Subtypes and Brain Structures Involved in

- Motion Processing ». *The Journal of Neuroscience* 31 (24): 8760-69.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0564-11.2011>.
- Rodriguez, Allen R., Luis Pérez de Sevilla Müller, et Nicholas C. Brecha. 2014. « The RNA binding protein RBPMS is a selective marker of ganglion cells in the mammalian retina ». *The Journal of comparative neurology* 522 (6): 1411-43. <https://doi.org/10.1002/cne.23521>.
- Ronca, Francesca, Julie S. Andersen, Volker Paech, et Richard U. Margolis. 2001. « Characterization of Slit Protein Interactions with Glypican-1 ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (31): 29141-47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100240200>.
- Rosenberg, Allison F., Jesse Isaacman-Beck, Clara Franzini-Armstrong, et Michael Granato. 2014. « Schwann Cells and Deleted in Colorectal Carcinoma Direct Regenerating Motor Axons Towards Their Original Path ». *The Journal of Neuroscience* 34 (44): 14668-81.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2007-14.2014>.
- Rothberg, J. M., J. R. Jacobs, C. S. Goodman, et S. Artavanis-Tsakonas. 1990. « Slit: An Extracellular Protein Necessary for Development of Midline Glia and Commissural Axon Pathways Contains Both EGF and LRR Domains. » *Genes & Development* 4 (12a): 2169-87.
<https://doi.org/10.1101/gad.4.12a.2169>.
- Rothberg, Jonathan Marc, David A. Hartley, Zenta Walther, et Spyros Artavanis-Tsakonas. 1988. « Slit: An EGF-Homologous Locus of D. Melanogaster Involved in the Development of the Embryonic Central Nervous System ». *Cell* 55 (6): 1047-59. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90249-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90249-8).
- Rowlands, Daire, Kristian K. Lensjø, Tovy Dinh, Sujeong Yang, Melissa R. Andrews, Torkel Hafting, Marianne Fyhn, James W. Fawcett, et Gunnar Dick. 2018. « AggreCAN Directs Extracellular Matrix-Mediated Neuronal Plasticity ». *The Journal of Neuroscience* 38 (47): 10102-13.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1122-18.2018>.
- Rutishauser. 1978. « Adhesion among neural cells of the chick embryo. IV. Role of the cell surface molecule CAM in the formation of neurite bundles in cultures of spinal ganglia ». *The Journal of Cell Biology* 79 (2): 382-93.
- Ryu, Jae K., Dimitrios Davalos, et Katerina Akassoglou. 2009. « Fibrinogen signal transduction in the nervous system ». *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 7 (Suppl 1): 151-54.
<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03438.x>.
- Sabatier, Christelle, Andrew S Plump, Le Ma, Katja Brose, Atsushi Tamada, Fujio Murakami, Eva Y.-H.P Lee, et Marc Tessier-Lavigne. 2004. « The Divergent Robo Family Protein Rig-1/Robo3 Is a Negative Regulator of Slit Responsiveness Required for Midline Crossing by Commissural Axons ». *Cell* 117 (2): 157-69. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00303-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00303-4).
- Saderi, N., F. Cazarez-Márquez, F.N. Buijs, R.C. Salgado-Delgado, M.A. Guzman-Ruiz, M. Del Carmen Basualdo, C. Escobar, et R.M. Buijs. 2013. « The NPY Intergeniculate Leaflet Projections to the Suprachiasmatic Nucleus Transmit Metabolic Conditions ». *Neuroscience* 246 (août): 291-300. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.05.004>.
- Sánchez-Camacho, Cristina, et Paola Bovolenta. 2008. « Autonomous and Non-Autonomous Shh Signalling Mediate the in Vivo Growth and Guidance of Mouse Retinal Ganglion Cell Axons ». *Development* 135 (21): 3531-41. <https://doi.org/10.1242/dev.023663>.
- Sanes, Joshua R., et Richard H. Masland. 2015. « The Types of Retinal Ganglion Cells: Current Status and Implications for Neuronal Classification ». *Annual Review of Neuroscience* 38 (1): 221-46.
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-034120>.
- Santos, Telma E., Barbara Schaffran, Nicolas Broguière, Liane Meyn, Marcy Zenobi-Wong, et Frank Bradke. 2020. « Axon Growth of CNS Neurons in Three Dimensions Is Amoeboid and Independent of Adhesions ». *Cell Reports* 32 (3): 107907.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107907>.
- Sarbassov, D. D., David A. Guertin, Siraj M. Ali, et David M. Sabatini. 2005. « Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-MTOR Complex ». *Science (New York, N.Y.)* 307 (5712): 1098-1101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>.

- Schaeffer, Julia, Céline Delpech, Floriane Albert, Stephane Belin, et Homaira Nawabi. 2020. « Adult Mouse Retina Explants: From ex vivo to in vivo Model of Central Nervous System Injuries ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 13.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2020.599948>.
- Schaeffer, Julia, David Tannahill, Jean-Michel Cioni, Dáire Rowlands, et Roger Keynes. 2018. « Identification of the Extracellular Matrix Protein Fibulin-2 as a Regulator of Spinal Nerve Organization ». *Developmental Biology* 442 (1): 101-14.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.06.014>.
- Schmidt, Tiffany M., Shih-Kuo Chen, et Samer Hattar. 2011. « Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions ». *Trends in neurosciences* 34 (11): 572-80.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.07.001>.
- Seabrook, Tania A., Timothy J. Burbidge, Michael C. Crair, et Andrew D. Huberman. 2017. « Architecture, Function, and Assembly of the Mouse Visual System ». *Annual Review of Neuroscience* 40 (1): 499-538. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-033842>.
- Seiffers, Rhona, Andrew J. Allchorne, et Clifford J. Woolf. 2006. « The Transcription Factor ATF-3 Promotes Neurite Outgrowth ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 32 (1): 143-54.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.03.005>.
- Serafini, Tito, Sophia A Colamarino, E.David Leonardo, Hao Wang, Rosa Beddington, William C Skarnes, et Marc Tessier-Lavigne. 1996. « Netrin-1 Is Required for Commissural Axon Guidance in the Developing Vertebrate Nervous System ». *Cell* 87 (6): 1001-14.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81795-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81795-X).
- 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).
- Seth, Anandita, James Culverwell, Mitchell Walkowicz, Sabrina Toro, Jens M. Rick, Stephan C. F. Neuhaus, Zoltan M. Varga, et Rolf O. Karlstrom. 2006. « *Belladonna* / (*Lhx2*) Is Required for Neural Patterning and Midline Axon Guidance in the Zebrafish Forebrain ». *Development* 133 (9): 1856-1856. <https://doi.org/10.1242/dev.02390>.
- Shearer, Morven C., et James W. Fawcett. 2001. « The Astrocyte/Meningeal Cell Interface – a Barrier to Successful Nerve Regeneration? » *Cell and Tissue Research* 305 (2): 267-73.
<https://doi.org/10.1007/s004410100384>.
- Shen, Yingjie, Alan P. Tenney, Sarah A. Busch, Kevin P. Horn, Fernando X. Cuascat, Kai Liu, Zhigang He, Jerry Silver, et John G. Flanagan. 2009. « PTP σ Is a Receptor for Chondroitin Sulfate Proteoglycan, an Inhibitor of Neural Regeneration ». *Science (New York, N.Y.)* 326 (5952): 592-96. <https://doi.org/10.1126/science.1178310>.
- Sheng, Lifu, Iryna Leshchyn'ska, et Vladimir Sytnyk. 2015. « Neural Cell Adhesion Molecule 2 Promotes the Formation of Filopodia and Neurite Branching by Inducing Submembrane Increases in Ca²⁺ Levels ». *The Journal of Neuroscience* 35 (4): 1739-52.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1714-14.2015>.
- Shi, Rongliang, Zhen Yang, Weiyan Liu, Bingya Liu, Ziping Xu, et Ziping Zhang. 2014. « Knockdown of Slit2 Promotes Growth and Motility in Gastric Cancer Cells via Activation of AKT/ β -Catenin ». *Oncology Reports* 31 (2): 812-18. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2887>.
- Silver, Jerry, et Jared H. Miller. 2004. « Regeneration beyond the Glial Scar ». *Nature Reviews Neuroscience* 5 (2): 146-56. <https://doi.org/10.1038/nrn1326>.
- Silver, R., et J. LeSauter. 1993. « Efferent Signals of the Suprachiasmatic Nucleus ». *Journal of Biological Rhythms* 8 Suppl: S89-92.
- Siman, R, JP Card, et LG Davis. 1990. « Proteolytic processing of beta-amyloid precursor by calpain I ». *The Journal of Neuroscience* 10 (7): 2400-2411. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-07-02400.1990>.
- Simionato, Elena, Natalia Barrios, Louise Duloquin, Elisabeth Boissonneau, Pierrette Lecorre, et François Agnès. 2007. « The Drosophila RNA-Binding Protein ELAV Is Required for

- Commissural Axon Midline Crossing via Control of Commissureless mRNA Expression in Neurons ». *Developmental Biology* 301 (1): 166-77.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.09.028>.
- Simpson, Julie H, Kimberly S Bland, Richard D Fetter, et Corey S Goodman. 2000. « Short-Range and Long-Range Guidance by Slit and Its Robo Receptors: A Combinatorial Code of Robo Receptors Controls Lateral Position ». *Neuron* 26 (1): 1-12.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6359\(00\)00001-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6359(00)00001-0).
- Smith, Patrice D., Fang Sun, Kevin Kyungsuk Park, Bin Cai, Chen Wang, Kenichiro Kuwako, Irene Martinez-Carrasco, Lauren Connolly, et Zhigang He. 2009. « SOCS3 deletion promotes optic nerve regeneration in vivo ». *Neuron* 64 (5): 617-23.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.021>.
- Snow, Diane M., Vance Lemmon, David A. Carrino, Arnold I. Caplan, et Jerry Silver. 1990. « Sulfated Proteoglycans in Astroglial Barriers Inhibit Neurite Outgrowth in Vitro ». *Experimental Neurology* 109 (1): 111-30. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(05\)80013-5](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(05)80013-5).
- Soares, Célia A., et Carol A. Mason. 2015. « Transient ipsilateral retinal ganglion cell projections to the brain: Extent, targeting and disappearance ». *Developmental neurobiology* 75 (12): 1385-1401. <https://doi.org/10.1002/dneu.22291>.
- Sorber, Rebecca, Yaroslav Teper, Abisola Abisoye-Ogunniyan, Joshua J. Waterfall, Sean Davis, J. Keith Killian, Marbin Pineda, et al. 2016. « Whole Genome Sequencing of Newly Established Pancreatic Cancer Lines Identifies Novel Somatic Mutation (c.2587G>A) in Axon Guidance Receptor Plexin A1 as Enhancer of Proliferation and Invasion ». *PLoS One* 11 (3): e0149833.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149833>.
- Sparks, Rohrer. 1990. « The Mouse Superior Colliculus: An Emerging Model for Studying Circuit Formation and Function - PMC ». 1990.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5816945/>.
- Srour, Myriam, Jean-Baptiste Rivière, Jessica M. T. Pham, Marie-Pierre Dubé, Simon Girard, Steves Morin, Patrick A. Dion, et al. 2010. « Mutations in DCC Cause Congenital Mirror Movements ». *Science* 328 (5978): 592-592. <https://doi.org/10.1126/science.1186463>.
- Stoeckli, Esther T. 2018. « Understanding Axon Guidance: Are We Nearly There Yet? ». *Development* 145 (10): dev151415. <https://doi.org/10.1242/dev.151415>.
- Stoll, G., J. W. Griffin, C. Y. Li, et B. D. Trapp. 1989. « Wallerian Degeneration in the Peripheral Nervous System: Participation of Both Schwann Cells and Macrophages in Myelin Degradation ». *Journal of Neurocytology* 18 (5): 671-83.
<https://doi.org/10.1007/BF01187086>.
- Stoll, Guido, et Hans Werner Müller. 2006. « Nerve Injury, Axonal Degeneration and Neural Regeneration: Basic Insights ». *Brain Pathology* 9 (2): 313-25. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1999.tb00229.x>.
- Straznicky, Charles, James C. Vickers, Robert Ga'brriel, et Marcello Costa. 1992. « A Neurofilament Protein Antibody Selectively Labels a Large Ganglion Cell Type in the Human Retina ». *Brain Research* 582 (1): 123-28. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90325-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90325-4).
- Strochlic, Laure, Asha Dwivedy, Francisca P. G. van Horck, Julien Falk, et Christine E. Holt. 2008. « A role for S1P signalling in axon guidance in the Xenopus visual system ». *Development (Cambridge, England)* 135 (2): 333-42. <https://doi.org/10.1242/dev.009563>.
- Sun, Fang, Kevin K. Park, Stephane Belin, Dongqing Wang, Tao Lu, Gang Chen, Kang Zhang, et al. 2011. « Sustained axon regeneration induced by co-deletion of PTEN and SOCS3 ». *Nature* 480 (7377): 372-75. <https://doi.org/10.1038/nature10594>.
- Sun, Karen Lai Wing, James P. Correia, et Timothy E. Kennedy. 2011. « Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions ». *Development* 138 (11): 2153-69.
<https://doi.org/10.1242/dev.044529>.
- Sun, Wenzhi, Qidong Deng, William R Levick, et Shigang He. 2006. « ON direction-selective ganglion cells in the mouse retina ». *The Journal of Physiology* 576 (Pt 1): 197-202.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.115857>.

- Symonds, A. C. E., C. E. King, C. A. Bartlett, Y. Sauvé, R. D. Lund, L. D. Beazley, S. A. Dunlop, et J. Rodger. 2007. « EphA5 and Ephrin-A2 Expression during Optic Nerve Regeneration: A 'Two-Edged Sword': Eph and Ephrin Expression Following CNS Injury ». *European Journal of Neuroscience* 25 (3): 744-52. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05321.x>.
- Sytnyk, Vladimir, Iryna Leshchyns'ka, Markus Delling, Galina Dityateva, Alexander Dityatev, et Melitta Schachner. 2002. « Neural cell adhesion molecule promotes accumulation of TGN organelles at sites of neuron-to-neuron contacts ». *The Journal of Cell Biology* 159 (4): 649-61. <https://doi.org/10.1083/jcb.200205098>.
- Takamatsu, Hyota, Tatsusada Okuno, et Atsushi Kumanogoh. 2010. « Regulation of immune cell responses by semaphorins and their receptors ». *Cellular and Molecular Immunology* 7 (2): 83-88. <https://doi.org/10.1038/cmi.2009.111>.
- Tamada, Atsushi, Tatsuro Kumada, Yan Zhu, Tomoko Matsumoto, Yumiko Hatanaka, Keiko Muguruma, Zhe Chen, et al. 2008. « Crucial roles of Robo proteins in midline crossing of cerebellofugal axons and lack of their up-regulation after midline crossing ». *Neural Development* 3 (novembre): 29. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-3-29>.
- Tanabe, Katsuhisa, Iris Bonilla, Jeffrey A. Winkles, et Stephen M. Strittmatter. 2003. « Fibroblast Growth Factor-Inducible-14 Is Induced in Axotomized Neurons and Promotes Neurite Outgrowth ». *The Journal of Neuroscience* 23 (29): 9675-86. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-29-09675.2003>.
- Tanelian, Darrell L., Michael A. Barry, Stephen Albert Johnston, Thuy Le, et George M. Smith. 1997. « Semaphorin III Can Repulse and Inhibit Adult Sensory Afferents in Vivo ». *Nature Medicine* 3 (12): 1398-1401. <https://doi.org/10.1038/nm1297-1398>.
- Tang, Song, Jin Qiu, Elena Nikulina, et Marie T. Filbin. 2001. « Soluble Myelin-Associated Glycoprotein Released from Damaged White Matter Inhibits Axonal Regeneration ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 18 (3): 259-69. <https://doi.org/10.1006/mcne.2001.1020>.
- Tang, Song, Robert W. Woodhall, Ying Jing Shen, Maria Elena deBellard, Jane L. Saffell, Patrick Doherty, Frank S. Walsh, et Marie T. Filbin. 1997. « Soluble Myelin-Associated Glycoprotein (MAG) Found in Vivo Inhibits Axonal Regeneration ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 9 (5-6): 333-46. <https://doi.org/10.1006/mcne.1997.0633>.
- Tang, Xiufeng, Jeannette E. Davies, et Stephen J.A. Davies. 2003. « Changes in Distribution, Cell Associations, and Protein Expression Levels of NG2, Neurocan, Phosphacan, Brevican, Versican V2, and Tenascin-C during Acute to Chronic Maturation of Spinal Cord Scar Tissue ». *Journal of Neuroscience Research* 71 (3): 427-44. <https://doi.org/10.1002/jnr.10523>.
- Tang, X.-Q. 2004. « Semaphorin3A Inhibits Nerve Growth Factor-Induced Sprouting of Nociceptive Afferents in Adult Rat Spinal Cord ». *Journal of Neuroscience* 24 (4): 819-27. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1263-03.2004>.
- Tanikawa, Chizu, Koichi Matsuda, Seisuke Fukuda, Yusuke Nakamura, et Hirofumi Arakawa. 2003. « P53RDL1 Regulates P53-Dependent Apoptosis ». *Nature Cell Biology* 5 (3): 216-23. <https://doi.org/10.1038/ncb943>.
- Tcherkezian, Joseph, Perry A. Brittis, Franziska Thomas, Philippe P. Roux, et John G. Flanagan. 2021. « Transmembrane receptor DCC associates with protein synthesis machinery and regulates translation ». *Cell* 184 (9): 2520. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.018>.
- Teh, Daniel Boon Loong, Ankshita Prasad, Wenxuan Jiang, Mohd. Zacky Ariffin, Sanjay Khanna, Abha Belorkar, Limsoon Wong, Xiaogang Liu, et Angelo H. ALL. 2017. « Transcriptome Analysis Reveals Neuroprotective aspects of Human Reactive Astrocytes induced by Interleukin 1 β ». *Scientific Reports* 7 (octobre): 13988. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13174-w>.
- Tessier-Lavigne, Marc, et Corey S. Goodman. 1996. « The Molecular Biology of Axon Guidance ». *Science* 274 (5290): 1123-33. <https://doi.org/10.1126/science.274.5290.1123>.
- Thompson, Amelia J, Eva K Pillai, Ivan B Dimov, Sarah K Foster, Christine E Holt, et Kristian Franze. 2019. « Rapid changes in tissue mechanics regulate cell behaviour in the developing embryonic brain ». *eLife* 8: e39356. <https://doi.org/10.7554/eLife.39356>.

- Thompson, Hannah, David Barker, Olivier Camand, et Lynda Erskine. 2006. « Slits Contribute to the Guidance of Retinal Ganglion Cell Axons in the Mammalian Optic Tract ». *Developmental Biology* 296 (2): 476-84. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.06.017>.
- Tom, Veronica J., Michael P. Steinmetz, Jared H. Miller, Catherine M. Doller, et Jerry Silver. 2004. « Studies on the Development and Behavior of the Dystrophic Growth Cone, the Hallmark of Regeneration Failure, in an In Vitro Model of the Glial Scar and after Spinal Cord Injury ». *The Journal of Neuroscience* 24 (29): 6531-39. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0994-04.2004>.
- Tomizawa, Y., Y. Sekido, M. Kondo, B. Gao, J. Yokota, J. Roche, H. Drabkin, M. I. Lerman, A. F. Gazdar, et J. D. Minna. 2001. « Inhibition of Lung Cancer Cell Growth and Induction of Apoptosis after Reexpression of 3p21.3 Candidate Tumor Suppressor Gene SEMA3B ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (24): 13954-59. <https://doi.org/10.1073/pnas.231490898>.
- Toyofuku, Toshihiko, Hong Zhang, Atsushi Kumanogoh, Noriko Takegahara, Fumikazu Suto, Junko Kamei, Kazuhiro Aoki, et al. 2004. « Dual roles of Sema6D in cardiac morphogenesis through region-specific association of its receptor, Plexin-A1, with off-track and vascular endothelial growth factor receptor type 2 ». *Genes & Development* 18 (4): 435-47. <https://doi.org/10.1101/gad.1167304>.
- Tran, Nicholas M., Karthik Shekhar, Irene E. Whitney, Anne Jacobi, Inbal Benhar, Guosong Hong, Wenjun Yan, et al. 2019. « Single-Cell Profiles of Retinal Ganglion Cells Differing in Resilience to Injury Reveal Neuroprotective Genes ». *Neuron* 104 (6): 1039-1055.e12. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.11.006>.
- Tuszynski, Mark H., et Oswald Steward. 2012. « Concepts and Methods for the Study of Axonal Regeneration in the CNS ». *Neuron* 74 (5): 777-91. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.006>.
- Ueno, Masaki, Yuka Nakamura, Hiroshi Nakagawa, Jesse K Niehaus, Mari Maezawa, Zirong Gu, Atsushi Kumanogoh, et al. 2020. « Olig2-Induced Semaphorin Expression Drives Corticospinal Axon Retraction After Spinal Cord Injury ». *Cerebral Cortex* 30 (11): 5702-16. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhaa142>.
- Uhl, George R, et Steven M Reppert. 1985. « Suprachiasmatic Nucleus Vasopressin mRNA: Circadian Variation in Normal and Brattleboro Rats » 232.
- V. H. PERRY*, M. C. BROWN*, AND S. GORDON. 1987. « The macrophage response to central and peripheral nerve injury. A possible role for macrophages in regeneration ». *The Journal of Experimental Medicine* 165 (4): 1218-23.
- Valle, Kara del, Michelle H. Theus, John R. Bethea, Daniel J. Liebl, et Jerome Ricard. 2011. « Neural progenitors proliferation is inhibited by EphB3 in the developing subventricular zone ». *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 29 (1): 9-14. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2010.10.005>.
- Van Den Pol, A.N., et K.L. Tsujimoto. 1985. « Neurotransmitters of the Hypothalamic Suprachiasmatic Nucleus: Immunocytochemical Analysis of 25 Neuronal Antigens ». *Neuroscience* 15 (4): 1049-86. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(85\)90254-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(85)90254-4).
- Van Hoecke, Annelies, Lies Schoonaert, Robin Lemmens, Mieke Timmers, Kim A Staats, Angela S Laird, Elke Peeters, et al. 2012. « EPHA4 Is a Disease Modifier of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Animal Models and in Humans ». *Nature Medicine* 18 (9): 1418-22. <https://doi.org/10.1038/nm.2901>.
- Varadarajan, Supraja G., John L. Hunyara, Natalie R. Hamilton, Alex L. Kolodkin, et Andrew D. Huberman. 2022. « Central Nervous System Regeneration ». *Cell* 185 (1): 77-94. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.10.029>.
- Vigouroux, Robin J, Quénol Cesar, Alain Chédotal, et Kim Tuyen Nguyen-Ba-Charvet. 2020. « Revisiting the role of Dcc in visual system development with a novel eye clearing method ». *eLife* 9: e51275. <https://doi.org/10.7554/eLife.51275>.

- Vilallongue, Noemie, et Homaira Nawabi. 2022. « Visual System Repair: What's Next? » *Neural Regeneration Research* 17 (4): 800-802. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.323076>.
- Vilallongue, Noemie, Julia Schaeffer, Anne-Marie Hesse, Céline Delpech, Béatrice Blot, Antoine Paccard, Elise Plissonnier, et al. 2022. « Guidance Landscapes Unveiled by Quantitative Proteomics to Control Reinnervation in Adult Visual System ». *Nature Communications* 13 (1): 6040. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33799-4>.
- Vitaterna, Martha Hotz, Christopher P. Selby, Takeshi Todo, Hitoshi Niwa, Carol Thompson, Ethan M. Fruechte, Kenichi Hitomi, et al. 1999. « Differential Regulation of Mammalian *Period* Genes and Circadian Rhythmicity by Cryptochromes 1 and 2 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (21): 12114-19. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.21.12114>.
- Vo, Tam, Daniela Carulli, Erich M.E. Ehlert, Jessica C.F. Kwok, Gunnar Dick, Vasil Mecollari, Elizabeth B. Moloney, et al. 2013. « The Chemorepulsive Axon Guidance Protein Semaphorin3A Is a Constituent of Perineuronal Nets in the Adult Rodent Brain ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 56 (septembre): 186-200. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2013.04.009>.
- Walz, Andreas, Richard B. Anderson, Atsushi Irie, Chi-Bin Chien, et Christine E. Holt. 2002. « Chondroitin Sulfate Disrupts Axon Pathfinding in the Optic Tract and Alters Growth Cone Dynamics ». *Journal of Neurobiology* 53 (3): 330-42. <https://doi.org/10.1002/neu.10113>.
- Walz, Andreas, Sarah McFarlane, Yardenah G. Brickman, Victor Nurcombe, Perry F. Bartlett, et Christine E. Holt. 1997. « Essential Role of Heparan Sulfates in Axon Navigation and Targeting in the Developing Visual System ». *Development* 124 (12): 2421-30. <https://doi.org/10.1242/dev.124.12.2421>.
- Wang, Hai U., Zhou-Feng Chen, et David J. Anderson. 1998. « Molecular Distinction and Angiogenic Interaction between Embryonic Arteries and Veins Revealed by Ephrin-B2 and Its Receptor Eph-B4 ». *Cell* 93 (5): 741-53. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81436-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81436-1).
- Wang, Hang, Yasuhiro Katagiri, Thomas E. McCann, Edward Unsworth, Paul Goldsmith, Zu-Xi Yu, Fei Tan, et al. 2008. « Chondroitin-4-Sulfation Negatively Regulates Axonal Guidance and Growth ». *Journal of Cell Science* 121 (Pt 18): 3083-91. <https://doi.org/10.1242/jcs.032649>.
- Wang, Hao, Neal G. Copeland, Debra J. Gilbert, Nancy A. Jenkins, et Marc Tessier-Lavigne. 1999. « Netrin-3, a Mouse Homolog of Human NTN2L, Is Highly Expressed in Sensory Ganglia and Shows Differential Binding to Netrin Receptors ». *The Journal of Neuroscience* 19 (12): 4938-47. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-12-04938.1999>.
- Wang, Jing, Xuelian He, Huyan Meng, Yi Li, Phillip Dmitriev, Feng Tian, Jessica C. Page, Richard Lu, et Zhigang He. 2020. « Robust myelination of regenerated axons induced by combined manipulations of GPR17 and microglia ». *Neuron* 108 (5): 876-886.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.09.016>.
- Wang, Kevin C., Vuk Koprivica, Jieun A. Kim, Rajeev Sivasankaran, Yong Guo, Rachel L. Neve, et Zhigang He. 2002. « Oligodendrocyte-Myelin Glycoprotein Is a Nogo Receptor Ligand That Inhibits Neurite Outgrowth ». *Nature* 417 (6892): 941-44. <https://doi.org/10.1038/nature00867>.
- Wang, Qing, Florencia Marcucci, Isadora Cerullo, et Carol Mason. 2016. « Ipsilateral and Contralateral Retinal Ganglion Cells Express Distinct Genes during Decussation at the Optic Chiasm ». *eNeuro* 3 (6): ENEURO.0169-16.2016. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0169-16.2016>.
- Wang, Zimei, Ashley Reynolds, Adam Kirry, Christopher Nienhaus, et Murray G. Blackmore. 2015. « Overexpression of Sox11 Promotes Corticospinal Tract Regeneration after Spinal Injury While Interfering with Functional Recovery ». *Journal of Neuroscience* 35 (7): 3139-45. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2832-14.2015>.
- Wanner, Ina B., Mark A. Anderson, Bingbing Song, Jaclynn Levine, Ana Fernandez, Zachary Gray-Thompson, Yan Ao, et Michael V. Sofroniew. 2013. « Glial Scar Borders Are Formed by Newly Proliferated, Elongated Astrocytes That Interact to Corral Inflammatory and Fibrotic Cells via STAT3-Dependent Mechanisms after Spinal Cord Injury ». *The Journal of Neuroscience* 33 (31): 12870-86. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2121-13.2013>.

- Webber, Christine A., Kimberly J. Christie, Chu Cheng, Jose A. Martinez, Bhagat Singh, Vandana Singh, Dorothy Thomas, et Douglas W. Zochodne. 2011. « Schwann Cells Direct Peripheral Nerve Regeneration through the Netrin-1 Receptors, DCC and Unc5H2 ». *Glia* 59 (10): 1503-17. <https://doi.org/10.1002/glia.21194>.
- Wehrle, Rosine, Emeline Camand, Alain Chedotal, Constantino Sotelo, et Isabelle Dusart. 2005. « Expression of *Netrin-1*, *Slit-1* and *Slit-3* but Not of *Slit-2* after Cerebellar and Spinal Cord Lesions ». *European Journal of Neuroscience* 22 (9): 2134-44. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04419.x>.
- Wei, Xiangyong, Lingfei Luo, et Jinzi Chen. 2019. « Roles of mTOR Signaling in Tissue Regeneration ». *Cells* 8 (9): 1075. <https://doi.org/10.3390/cells8091075>.
- Wen, Shao'ang, Danyi Ma, Meng Zhao, Lucheng Xie, Qingqin Wu, Lingfeng Gou, Chuanzhen Zhu, Yuqi Fan, Haifang Wang, et Jun Yan. 2020. « Spatiotemporal Single-Cell Analysis of Gene Expression in the Mouse Suprachiasmatic Nucleus ». *Nature Neuroscience* 23 (3): 456-67. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0586-x>.
- Williams, Scott E., Martin Grumet, David R. Colman, Mark Henkemeyer, Carol A. Mason, et Takeshi Sakurai. 2006. « A Role for Nr-CAM in the Patterning of Binocular Visual Pathways ». *Neuron* 50 (4): 535-47. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.03.037>.
- Williams, Scott E., Fanny Mann, Lynda Erskine, Takeshi Sakurai, Shiniu Wei, Derrick J. Rossi, Nicholas W. Gale, Christine E. Holt, Carol A. Mason, et Mark Henkemeyer. 2003. « Ephrin-B2 and EphB1 Mediate Retinal Axon Divergence at the Optic Chiasm ». *Neuron* 39 (6): 919-35. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2003.08.017>.
- Wilson, Nicole H., et Esther T. Stoeckli. 2013. « Sonic Hedgehog Regulates Its Own Receptor on Postcrossing Commissural Axons in a Glypican1-Dependent Manner ». *Neuron* 79 (3): 478-91. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.025>.
- Winter, Fred De, Tam Vo, Floor J. Stam, Liselijn A.B. Wisman, Peter R. Bär, Simone P. Niclou, Freek L. Van Muiswinkel, et Joost Verhaagen. 2006. « The Expression of the Chemorepellent Semaphorin 3A Is Selectively Induced in Terminal Schwann Cells of a Subset of Neuromuscular Synapses That Display Limited Anatomical Plasticity and Enhanced Vulnerability in Motor Neuron Disease ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 32 (1-2): 102-17. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.03.002>.
- Wong, Edwin W., Stephen D. Glasgow, Lianne J. Trigiani, Daryan Chitsaz, Vladimir Rymar, Abbas Sadikot, Edward S. Ruthazer, Edith Hamel, et Timothy E. Kennedy. 2019. « Spatial memory formation requires netrin-1 expression by neurons in the adult mammalian brain ». *Learning & Memory* 26 (3): 77-83. <https://doi.org/10.1101/lm.049072.118>.
- Wright, Kevin M., Krissy 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, Haitao, Jundie Fan, Lingling Zhu, Shuhong Liu, Yan Wu, Tong Zhao, Yanrui Wu, Xuefeng Ding, Wenhong Fan, et Ming Fan. 2009. « Sema4C Expression in Neural Stem/Progenitor Cells and in Adult Neurogenesis Induced by Cerebral Ischemia ». *Journal of Molecular Neuroscience* 39 (1-2): 27-39. <https://doi.org/10.1007/s12031-009-9177-8>.
- Wu, Hope H., R. John Cork, et R. Ranney Mize. 2000. « Normal Development of the Ipsilateral Retinocollicular Pathway and Its Disruption in Double Endothelial and Neuronal Nitric Oxide Synthase Gene Knockout Mice ». *The Journal of Comparative Neurology* 426 (4): 651-65. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20001030\)426:4<651::AID-CNE11>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20001030)426:4<651::AID-CNE11>3.0.CO;2-X).
- Wu, Jie-hong, Ya-nan Li, An-qi Chen, Can-dong Hong, Chun-lin Zhang, Hai-ling Wang, Yi-fan Zhou, et al. 2020. « Inhibition of Sema4D/PlexinB1 signaling alleviates vascular dysfunction in diabetic retinopathy ». *EMBO Molecular Medicine* 12 (2): e10154. <https://doi.org/10.15252/emmm.201810154>.
- Wu, Jie-Hong, Yanan Li, Yi-Fan Zhou, James Haslam, Opoku Nana Elvis, Ling Mao, Yuan-Peng Xia, et Bo Hu. 2017. « Semaphorin-3E Attenuates Neointimal Formation via Suppressing VSMCs

- Migration and Proliferation ». *Cardiovascular Research* 113 (14): 1763-75.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvx190>.
- Xie, Jianmin, et Hao Wang. 2017. « Semaphorin 7A as a potential immune regulator and promising therapeutic target in rheumatoid arthritis ». *Arthritis Research & Therapy* 19: 10.
<https://doi.org/10.1186/s13075-016-1217-5>.
- Xie, Zongyi, Lei Huang, Budbazar Enkhjargal, Cesar Reis, Weifeng Wan, Jiping Tang, Yuan Cheng, et John H. Zhang. 2018. « Recombinant Netrin-1 Binding UNC5B Receptor Attenuates Neuroinflammation and Brain Injury via PPAR γ /NF κ B Signaling Pathway after Subarachnoid Hemorrhage in Rats ». *Brain, behavior, and immunity* 69 (mars): 190-202.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.012>.
- Yamashita, Masayuki. 2013. « Electric Axon Guidance in Embryonic Retina: Galvanotropism Revisited ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 431 (2): 280-83.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.115>.
- . 2015. « Weak electric fields serve as guidance cues that direct retinal ganglion cell axons in vitro ». *Biochemistry and Biophysics Reports* 4 (septembre): 83-88.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.08.022>.
- Yang, Long, David S. Garbe, et Greg J. Bashaw. 2009. « A Frazzled/DCC-Dependent Transcriptional Switch Regulates Midline Axon Guidance ». *Science (New York, N.Y.)* 324 (5929): 944-47.
<https://doi.org/10.1126/science.1171320>.
- Yazdani, Umar, et Jonathan R Terman. 2006. « The Semaphorins ». *Genome Biology* 7 (3): 211.
<https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-3-211>.
- Yin, Kai, Linjun Wang, Xuan Zhang, Zhongyuan He, Yiwen Xia, Jianghao Xu, Song Wei, et al. 2017. « Netrin-1 Promotes Gastric Cancer Cell Proliferation and Invasion via the Receptor Neogenin through PI3K/AKT Signaling Pathway ». *Oncotarget* 8 (31): 51177-89.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.17750>.
- Yiu, Glenn, et Zhigang He. 2006. « Glial inhibition of CNS axon regeneration ». *Nature reviews. Neuroscience* 7 (8): 617-27. <https://doi.org/10.1038/nrn1956>.
- Yokoyama, Nobuhiko, Mario I. Romero, Chad A. Cowan, Pedro Galvan, Françoise Helmbacher, Patrick Charnay, Luis F. Parada, et Mark Henkemeyer. 2001. « Forward Signaling Mediated by Ephrin-B3 Prevents Contralateral Corticospinal Axons from Recrossing the Spinal Cord Midline ». *Neuron* 29 (1): 85-97. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00182-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00182-9).
- Yonehara, Keisuke, Hiroshi Ishikane, Hiraki Sakuta, Takafumi Shintani, Kayo Nakamura-Yonehara, Nilton L. Kamiji, Shiro Usui, et Masaharu Noda. 2009. « Identification of Retinal Ganglion Cells and Their Projections Involved in Central Transmission of Information about Upward and Downward Image Motion ». *PLoS ONE* 4 (1): e4320.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004320>.
- Yoshida, Yutaka, Barbara Han, Monica Mendelsohn, et Thomas M. Jessell. 2006. « PlexinA1 signaling directs sensory axon segregation in the developing spinal cord: a role for proprioceptive axon exclusion in cutaneous afferent organization ». *Neuron* 52 (5): 775-88.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.10.032>.
- Yoshikawa, Shingo, Randall D. McKinnon, Michelle Kokel, et John B. Thomas. 2003. « Wnt-Mediated Axon Guidance via the Drosophila Derailed Receptor ». *Nature* 422 (6932): 583-88.
<https://doi.org/10.1038/nature01522>.
- Yu, Panpan, Craig S. Pearson, et Herbert M. Geller. 2018. « Flexible Roles for Proteoglycan Sulfation and Receptor Signaling ». *Trends in neurosciences* 41 (1): 47-61.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.10.005>.
- Yuasa-Kawada, Junichi, Mariko Kinoshita-Kawada, Guan Wu, Yi Rao, et Jane Y. Wu. 2009. « Midline crossing and slit responsiveness of commissural axons require USP33 ». *Nature neuroscience* 12 (9): 1087-89. <https://doi.org/10.1038/nn.2382>.
- Zelina, Pavol, Hasan X. Avci, Karsten Thelen, et G. Elisabeth Pollerberg. 2005. « The Cell Adhesion Molecule NrCAM Is Crucial for Growth Cone Behaviour and Pathfinding of Retinal Ganglion Cell Axons ». *Development* 132 (16): 3609-18. <https://doi.org/10.1242/dev.01934>.

- Zhang, Chengkang, Kimberly K. Truong, et Qun-Yong Zhou. 2009. « Efferent Projections of Prokineticin 2 Expressing Neurons in the Mouse Suprachiasmatic Nucleus ». *PLoS ONE* 4 (9): e7151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007151>.
- Zhang, Liang, Shinjiro Kaneko, Kaoru Kikuchi, Akihiko Sano, Miho Maeda, Akiyoshi Kishino, Shinsuke Shibata, et al. 2014. « Rewiring of regenerated axons by combining treadmill training with semaphorin3A inhibition ». *Molecular Brain* 7 (mars): 14. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-7-14>.
- Zhang, Min, Qiang Zhou, Yuncin Luo, Tara Nguyen, Mark I. Rosenblatt, et Victor H. Guaiquil. 2018. « Semaphorin3A induces nerve regeneration in the adult cornea—a switch from its repulsive role in development ». *PLoS ONE* 13 (1): e0191962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191962>.
- Zhang, Rongrong, Yanping Wu, Fei Xie, Yiliang Zhong, Yu Wang, Mengxue Xu, Jinzhou Feng, Jason Charish, Philippe P. Monnier, et Xinyue Qin. 2018. « RGMa mediates reactive astrogliosis and glial scar formation through TGFβ1/Smad2/3 signaling after stroke ». *Cell Death and Differentiation* 25 (8): 1503-16. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0058-y>.
- Zhang, YaJun, Ann-Charlotte Granholm, Kyounghee Huh, Lufei Shan, Oscar Diaz-Ruiz, Nasir Malik, Lars Olson, et al. 2012. « PTEN deletion enhances survival, neurite outgrowth and function of dopamine neuron grafts to MitoPark mice ». *Brain* 135 (9): 2736-49. <https://doi.org/10.1093/brain/aws196>.
- Zhang, Yuannv, Zhaoping Qiu, Lin Wei, Ruqi Tang, Baofeng Lian, Yingjun Zhao, Xianghuo He, et Lu Xie. 2014. « Integrated Analysis of Mutation Data from Various Sources Identifies Key Genes and Signaling Pathways in Hepatocellular Carcinoma ». *PloS One* 9 (7): e100854. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100854>.
- Zhao, Xiwu, Ben K Stafford, Ashley L Godin, W Michael King, et Kwoon Y Wong. 2014. « Photoresponse diversity among the five types of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells ». *The Journal of Physiology* 592 (Pt 7): 1619-36. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.262782>.
- Zhou, Xiang, Shalaka Wahane, Marie-Sophie Friedl, Michael Kluge, Caroline C. Friedel, Kleopatra Avrampou, Venetia Zachariou, et al. 2020. « Microglia and macrophages promote corraling, wound compaction and recovery after spinal cord injury via Plexin-B2 ». *Nature neuroscience* 23 (3): 337-50. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0597-7>.
- Zimmer, Manuel, Amparo Palmer, Jenny Köhler, et Rüdiger Klein. 2003. « EphB–EphrinB Bi-Directional Endocytosis Terminates Adhesion Allowing Contact Mediated Repulsion ». *Nature Cell Biology* 5 (10): 869-78. <https://doi.org/10.1038/ncb1045>.
- Zou, Yimin, Esther Stoeckli, Hang Chen, et Marc Tessier-Lavigne. 2000. « Squeezing Axons Out of the Gray Matter: A Role for Slit and Semaphorin Proteins from Midline and Ventral Spinal Cord ». *Cell* 102 (3): 363-75. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00041-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00041-6).
- Zukor, Katherine, Stephane Belin, Chen Wang, Nadia Keelan, Xuhua Wang, et Zhigang He. 2013. « Short Hairpin RNA against PTEN Enhances Regenerative Growth of Corticospinal Tract Axons after Spinal Cord Injury ». *The Journal of Neuroscience* 33 (39): 15350-61. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2510-13.2013>.

ANNEXE n°1

Customization of translational complex regulates mRNA-specific translation to control CNS regeneration

Article en révisions (dernier round)

Julia Schaeffer, Noemie Vilallongue, Charlotte Decourt, Béatrice Blot, Nacera El Bakdouri, Elise Plissonnier, Blandine Excoffier, Antoine Paccard, Jean-Jacques Diaz, Sandrine Humbert, Frederic Catez, Frederic Saudou, Homaira Nawabi*, Stephane Belin*

*Lead contacts

Customization of translational complex regulates mRNA-specific translation to control CNS regeneration

Authors

Julia Schaeffer¹, Noemie Vilallongue¹, Charlotte Decourt¹, Beatrice Blot¹, Nacera El Bakdouri¹, Elise Plissonnier¹, Blandine Excoffier¹, Antoine Paccard¹, Jean-Jacques Diaz², Sandrine Humbert¹, Frederic Catez², Frederic Saudou¹, Homaira Nawabi^{1*}, Stephane Belin^{1*}

¹Univ. Grenoble Alpes, Inserm, U1216, CHU Grenoble Alpes, Grenoble Institut Neurosciences, 38000 Grenoble, France

²Inserm U1052, CNRS UMR5286 Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France. Centre Léon Bérard F-69008 Lyon, France. Université de Lyon 1, F-69000 Lyon, France

*These authors contributed equally. Correspondence to: stephane.belin@inserm.fr; homaira.nawabi@inserm.fr

Abstract

In the adult mammalian central nervous system (CNS), axons fail to regenerate spontaneously after injury, due to a combination of extrinsic and intrinsic factors. Despite recent advances targeting the intrinsic regenerative properties of adult neurons, the molecular mechanisms underlying axon regeneration are not fully understood. Here, we uncover a regulatory mechanism that controls the expression of key proteins involved in regeneration at the translational level. Our results show that mRNA-specific translation is critical to promote axon regeneration. Indeed, we demonstrate that specific ribosome-interacting proteins, such as the protein Huntingtin (HTT), control selectively the translation of a specific subset of mRNAs. Moreover, modulating the expression of these translationally regulated mRNAs is crucial to promote axon regeneration. Altogether, our findings highlight that selective translation through customization of the translational complex is a key mechanism of axon regeneration with major implications in the development of therapeutic strategies for CNS repair.

Introduction

In adult mammals, central nervous system (CNS) neurons are unable to regenerate after injury, leading to a permanent and irreversible loss of motor and/or cognitive functions. While studies have focused on the growth-inhibitory role of the environment after injury^{1,2}, it is now clear that the regeneration failure of injured axons depends on the intrinsic properties of adult neurons³. Large-scale analysis of neuronal populations allowed to identify several factors, essential for neuroprotection and regeneration and actively controlled during development, including mTOR⁴, Krüppel-like factors⁵ and JAK/STAT⁶. Furthermore, the lesion itself triggers regulation of molecular signaling pathways, which further impairs the intrinsic regeneration ability of injured neurons⁷. In the visual system, proteomic and transcriptomic data analyses have established the impact of axon injury on retinal ganglion cells (RGC) response,

thereby highlighting how the injury blocks survival and growth programs, and favours cell death-associated ones⁷⁻⁹.

The modulation of several signaling pathways, alone or in combination, can promote long-distance CNS regeneration^{4,5,7,10}, yet only few neurons are able to respond to such modulation, and it remains challenging to obtain sufficient axon growth to rebuild a functional circuit. Therefore, there is a need to identify new candidates to promote axon regeneration. Previously, comparative proteomic analysis of RGC in intact condition and after optic nerve injury highlighted the wild-type (WT) form of the protein Huntingtin (HTT) as a key regulator of the neuronal injury response⁷. Consistently, HTT has been identified as a central signaling hub of neural progenitor cell grafting-induced regeneration in the lesioned spinal cord¹¹. However, the underlying mechanisms remain unknown, as are HTT's physiological functions in the adult CNS.

Indeed, HTT is best described for causing Huntington's neurodegenerative disease when mutated. HTT mutation consists in abnormal CAG expansion in gene's exon 1, leading to a toxic poly-glutamine stretch in the N-terminal region¹². Interestingly, HTT has been linked to several biological processes critical for neuronal survival and axon regeneration. HTT interacts with microtubule-associated molecular motors to control axonal transport¹³, a major process involved in intrinsic regenerative properties of neurons. In particular, HTT is key in the regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transport¹⁴, involved in neuroprotection¹⁵.

In order to unlock CNS regenerative properties, many studies have focused on transcriptional regulation during development or after injury. Yet, transcriptional modulation is not sufficient to fully recapitulate axon growth. In contrast, the process of mRNA translation into proteins, the functional readout of gene expression in cells, remains poorly described in this context. Even though mTOR activation triggers axon growth, its exact contribution to translational control in axon regeneration is not described. Protein synthesis is a highly ordered process that involves, along with messenger RNA (mRNA) and transfer RNA (tRNA), the translational complex, composed of the ribosome, translation factors and non-canonical associated factors¹⁶. Several studies point out that mRNA and protein levels correlate only partially in cells¹⁷, depending on cell types and physio-pathological conditions.

In this study, we show that HTT is dynamically regulated upon optic nerve injury and that it is indispensable for axon regeneration. Through the analysis of HTT phospho-mutant mouse lines, we show that HTT-mediated control of axon regeneration is not based on its role of regulator of BDNF axonal transport. We further show that HTT interacts with the translational complex and that it does not control translation at the global level. Using comparative transcriptomic and translational analysis, we show that HTT regulates specifically the association of a subset of regeneration-associated mRNAs to ribosomes, thereby controlling their expression at the level of translation and not transcription. This is the case of the mRNA target *Tox2*, positively regulated by HTT at the translational level. Finally, modulation of the HTT translationally-regulated target *Tox2* is critical to achieve axon regeneration of lesioned RGC in the adult CNS. Altogether, we provide evidence that the interaction of specific proteins such as HTT with ribosomes leads to the translation of specific mRNAs. Our results point out the key role of selective translation, through ribosome customization, in CNS axon regeneration.

Results

HTT is required for axon regeneration

Several studies have suggested that HTT is involved in CNS regeneration, although the underlying mechanisms remain unknown^{7,11}. HTT is ubiquitously expressed in the nervous system¹⁸, but few data are available on the visual system. We first analysed HTT expression in the mature retina. We found that HTT is robustly expressed in the retinal ganglion cell (RGC) layer of adult mice, both at mRNA and protein levels (**Figure 1A-C**). We then analysed HTT expression in RGC 3 days after optic nerve crush injury (ONC) (3dpc). We found that HTT is downregulated after injury, at the transcript (**Figure 1A-B**) and protein levels (**Figure 1C**). The decrease of HTT expression correlates with the reduced regeneration capacity following CNS axon injury.

To determine the role of HTT in axon regeneration, we deleted HTT specifically in RGC by injecting Cre-expressing AAV2 (AAV2-Cre), or AAV2-placental alkaline phosphatase (AAV2-Plap) as a control, in the eyes of HTT-floxed (HTT^{fl/fl}) mice¹⁹ (**Figure S1A, B**). In line with the decrease in HTT expression in lesioned, non-regenerative RGC, we observed no regeneration in the HTT-deleted condition (**Figure S1C, D**). In addition, no significant difference in RGC numbers was detected when comparing HTT-deleted and control RGC, neither in intact condition (**Figure S1E, F**) nor at 14 days post-injury (14dpc) (**Figure S1H, I**). As WT mice have a limited regenerative capacity, we used a system primed for regeneration to investigate HTT function in axon regrowth. The activation of mTOR pathway through deletion of phosphatase and tensin homolog (Pten) is a well-described paradigm of axon regeneration⁴. In contrast to WT RGC, we found that, upon mTOR activation, HTT expression remains stable at 3dpc compared to intact condition (**Figure 1D**). Therefore, to determine how HTT affects axon regeneration, we crossed HTT^{fl/fl} mice with Pten^{fl/fl} mice and injected AAV2-Cre to co-delete Pten and HTT in RGC (**Figure S1K**). Strikingly, axon regeneration at 14dpc was suppressed in Pten/HTT-deleted RGC in contrast to Pten deletion alone (**Figure 1E, F**). This effect was already observed at 3dpc (**Figure S1L, M**), indicating that HTT is required early in the regenerative process. These results demonstrate that HTT is essential for axon regeneration.

We then examined whether the loss of axon regeneration induced by HTT deletion was due to a decrease in RGC survival. We stained whole-mount retinas for RBPM5 (RNA-binding protein with multiple splicing), a specific RGC marker²⁰. No significant difference was found between Pten/HTT-deleted and Pten-deleted RGC in intact condition (**Figure 1G, H**) and at 14dpc (**Figure 1J, K**), which shows that HTT is necessary for axon regeneration but not for RGC survival. We then investigated whether the suppression of regeneration caused by HTT deletion is linked to an alteration in mTOR pathway. To do so, we analyzed the protein levels of phosphorylated ribosomal protein S6 (pS6), a functional readout of mTOR activation²¹. Numbers of pS6-positive RGC were similar in Pten/HTT-deleted and Pten-deleted RGC, both in intact condition (**Figure 1G, I**) and at 14dpc (**Figure 1J, L**). Similarly, no difference in pS6 level was observed between HTT-deleted and control RGC, in intact condition (**Figure S1E, G**) and at 14dpc (**Figure S1H, J**). Therefore, HTT deletion does not impact mTOR activation induced by Pten deletion. Altogether, our results show that HTT is a critical intrinsic factor of CNS regeneration that acts independently of mTOR and neuronal survival.

We then asked the extent of HTT-mediated control of regeneration and analyzed the outcome of HTT modulation in the peripheral nervous system (PNS). First, we assessed HTT expression in the PNS by focusing on the lumbar dorsal root ganglion (DRG) neurons, whose peripheral branch projects into the sciatic nerve. In contrast to the CNS, HTT expression remains stable in DRG after sciatic nerve injury (**Figure S1N**). We then tested the effect of HTT deletion on these neurons, via intrathecal injection of a Cre-expressing AAV8 (AAV8-Cre) in HTT^{fl/fl} mice to delete HTT in DRG neurons (**Figure S1O-P**). Interestingly, HTT-deleted DRG axons displayed shorter regeneration than control ones at 3dpc, as shown by the regeneration index calculated at 50% of regeneration extent (**Figure S1Q, R**). This result demonstrates that HTT expression correlates with the capacity of DRG peripheral axons to regenerate

after sciatic nerve injury and that HTT is crucial for regeneration in the PNS, suggesting a general contribution of HTT to axon regeneration process.

HTT control of regeneration is not mediated by its role in BDNF axonal transport

We then sought to determine the molecular mechanism underlying HTT-mediated control of CNS regeneration. We hypothesized that HTT controls regeneration through its role in BDNF axon trafficking. Indeed, one feature consistently described for the WT form of HTT is its role as a scaffold protein in molecular motor complexes for intracellular trafficking of BDNF and its receptor TrkB^{13,14,22-24}, both of which are relevant to axon regeneration. As previously demonstrated in cortical neurons, HTT phosphorylation state at Serine 421 (S421) controls directionality of BDNF axonal transport²² (**Figure 2A**). We verified that the phosphorylated state of HTT at S421 controls BDNF transport in adult RGC axons. To do so, we used an AAV2 expressing constitutively active Rheb1 (cRheb), which activates mTOR pathway and consequently promotes mature RGC axon growth²⁵. We injected AAV2-cRheb in HTT S421^{A/A} mice, where HTT unphosphorylatable state at S421 promotes BDNF retrograde transport, and in HTT S421^{D/D} mice, where HTT constitutively phosphorylated state at S421 promotes BDNF anterograde transport. One day after, we injected AAV2-BDNF-tdTomato to track BDNF-carrying vesicles. Two weeks after virus injection, we set up adult retina explant cultures²⁶ (**Figure S2A**). Using live imaging, we showed that the S421 point mutations of HTT control indeed the directionality of BDNF transport in adult RGC axons, with an increase of BDNF retrograde transport in HTT S421^{A/A} condition and an increase of BDNF anterograde transport in HTT S421^{D/D} condition (**Figure S2B**), as described²².

Next, to explore the potential role of HTT-mediated transport of BDNF in axon regeneration, we performed ONC and analyzed axon regeneration in HTT S421^{A/A} and S421^{D/D} mutant mice^{13,22} (**Figure 2A**). This analysis revealed no difference between heterozygous (S/A, S/D), homozygous (A/A, D/D) and WT (S/S) mice (**Figure 2B, D**). We concluded from these data that enhancing HTT-mediated retrograde (S421A) or anterograde (S421D) BDNF transport did not improve nor alter axon regeneration. We also analysed RGC survival in these mutant mice and found no difference in RGC numbers, in intact and injured conditions (**Figure 2C, E, F**). Moreover, we performed the same set of experiments in other HTT phospho-mutant mouse lines, where Serines 1181 and 1201 (S1181/S1201) are mutated to control dynamics of BDNF axonal transport^{13,27} (**Figure S2C**). We also found no change in axon regeneration nor in RGC survival in these mutant mice (**Figure S2D-H**).

As WT mice have a limited regenerative capacity, we assessed the effect of the S421 point mutations in a regenerative context. To do so, we activated the mTOR pathway via cRheb overexpression²⁵ in RGC of the S421 phospho-mutant mice (**Figure 2G**). We found that AAV2-cRheb significantly enhanced axon regeneration, with no difference between heterozygous (S/A, S/D), homozygous (A/A, D/D) and WT (S/S) mice. Hence, no difference was observed in the regenerative effect of mTOR activation when HTT-mediated retrograde (S421A) or anterograde (S421D) transport of BDNF is modulated (**Figure 2G, H**). We analysed RGC survival and pS6 protein levels and found no difference in RGC survival between S421 phospho-mutant and WT mice (**Figure 2I-K**). Altogether, these results suggest that HTT is involved in axon regeneration independently of BDNF axonal transport.

HTT interacts with ribosomes

To identify the molecular mechanism by which HTT controls axon regeneration, we analysed WT HTT binding partners identified by Shirasaki and colleagues in the mouse brain²⁸. We submitted the list of 747 putative HTT-interacting proteins to network clustering analysis, using a Markov Clustering Algorithm with STRING program²⁹. A dense cluster of ribosomal components was highlighted, as well as translation-associated factors, RNA-binding proteins and aminoacyl tRNA synthetases (**Figure S3A, Supplementary Table 1**). This analysis suggests that HTT interacts with the translational complex. We performed HTT immunoprecipitation using mouse embryonic fibroblasts (MEF). We found that the ribosomal proteins of the small subunit RPS6, and of the large subunit RPL3 and RPL22 immunoprecipitate with HTT. This is also the case of the translation initiation factor eIF4G and the RNA-binding protein Pabp1, supporting HTT interaction with the translational complex (**Figure S3B, C**).

Subsequently, we performed purification of ribosomes from MEF lysate and whole retina lysate³⁰ (**Figure 3A**). The ribosomal proteins RPL22 and RPS6 are enriched in the ribosomal fraction, while we observed minimal contamination of nuclear and mitochondrial components (**Figure 3B**). We detected the protein HTT in the ribosomal fraction, both in MEF and in the retina, further confirming that HTT interacts with the translational complex (**Figure 3B**). In particular, HTT co-fractionates with ribosomes even in increasingly stringent conditions (**Figure 3C**), meaning that HTT interacts strongly with ribosomes. Additionally, RNase I treatment of cell lysate did not remove HTT from the ribosomal fraction, unlike the RNA-binding protein Pabp1 (**Figure 3D**). Thus, our results suggest that RNA degradation and ribosome dissociation do not affect HTT's presence in the ribosomal fraction, showing that HTT is a ribosome-interacting protein independently of RNA.

To determine the nature of HTT interaction with ribosomes, we performed a polysome profiling on MEF lysate. This method allows to distinguish between the small subunit (40S), the large subunit (60S), the monosome (80S) and the polysomes (fractions where mRNAs carry multiple ribosomes), which are heavier with increasing translational activity. Interestingly, we found that HTT is present in both 40S and 60S fractions, in the monosome fraction, and, to a lesser extent, in the light polysome fractions (**Figure 3E**). HTT interaction with ribosomal subunits was not altered by chemical disruption of the ribosome (EDTA treatment), blockage of translation initiation (harringtonin treatment), blockage of translation elongation (puromycin treatment) and RNA degradation (RNase I treatment) (**Figure S3D, E**). mRNA is necessary for the formation of active 80S ribosomes³¹ and degradation of ribosomal RNA (rRNA) can dissociate ribosomes³². Thus, our results are consistent with the fact that HTT interacts with ribosomes in an RNA-independent manner. Altogether, these results demonstrate that HTT can bind to both subunits, independently of ongoing translation.

We further validated this interaction specifically in RGC using in situ proximity ligation assay (PLA) staining of HTT and components of the ribosomal complex (**Figure 3F**). Using PLA on WT mouse retina sections, we showed that HTT interacts with rRNA and with the ribosomal protein RPS6 (**Figure 3F, G**). These results demonstrate that HTT associates with the translational complex and suggest a role for HTT in translation regulation during CNS regeneration.

HTT controls mRNA-specific translation

Based on the interaction between HTT and the translational complex, we further investigated its role in controlling protein synthesis. We first examined whether HTT controls global protein translation. We used a Surface Sensing of Translation (SUnSET) technique to compare the level of global protein synthesis in WT and HTT-deleted samples. We deleted HTT by transducing HTT^{fl/fl} MEF with a Cre-

expressing lentivirus. Using puromycin incorporation in MEF, we found that HTT deletion had no effect on the level of global protein synthesis (**Figure 4A**). This result was confirmed in vivo, in RGC, using fluorescent detection of protein synthesis with the SUnSET approach by O-propargyl-puromycin (OPP) incorporation. As a control, the protein synthesis inhibitor anisomycin inhibited OPP incorporation in vivo (**Figure 4B**). Consistent with what was previously shown⁴, we observed that new protein synthesis significantly decreases at 3dpc in WT RGC (**Figure 4C**). Moreover, HTT deletion in intact RGC did not affect the global level of protein synthesis (**Figure 4D**), suggesting that HTT does not control global translation in vivo.

Furthermore, we analysed how HTT affected the outcome of ONC in terms of protein synthesis in the regenerative condition (mTOR activation). When comparing Pten/HTT-deleted and Pten-deleted RGC, we saw no difference in new protein synthesis in intact condition and at 3dpc (**Figure 4E, F**). This was already the case at 12 hours post-crush (12hpc) and at 1dpc, but also at a later timepoint post-injury (7dpc) (**Figure S4A-C**). In contrast, the extent of protein synthesis was significantly lower upon ONC in control condition (Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap) (**Figure 4F, Figure S4A-C**). Altogether, these results show that HTT does not regulate the global rate of protein synthesis.

Nonetheless, the interaction between HTT and the translation machinery suggests a role in the regulation of protein synthesis. Thus, we examined whether HTT regulates translation of specific mRNA subsets. To this end, we deleted HTT in MEF (**Figure 5A, B**) and performed RNA-sequencing of total cellular RNA and ribosome-associated RNA (**Figure 5C**). We then performed differential expression analysis by comparing HTT-deleted and control samples independently for both datasets (**Supplementary Table 2, Figure 5D**). From this analysis, we identified 279 genes displaying differential transcriptional regulation and 131 genes displaying differential ribosome association upon HTT deletion (for each dataset: false discovery rate (FDR) p-value<0.05, |log₂(fold-change)|>1) (**Figure 5E**). Strikingly, out of these 131 translationally-regulated genes, we found 115 genes for which total RNA expression level was unchanged (differential expressed genes (DEG) translome only), meaning that their expression is not regulated at the transcriptional level (**Figure 5E, Figure S5A, B**). We found that the correlation between transcriptional and translational regulation of all differentially regulated genes is only partial (**Figure 5F**). We then normalized the log-fold-change of the translational regulation by that of the transcriptional regulation for all individual hits. The plot of log-fold-changes of the translome versus the transcriptome revealed target mRNAs whose translation is controlled by HTT (translational changes only), but whose total RNA level is not modified (**Figure 5G**). Very interestingly, from the list of transcripts with differential association to ribosomes, we found receptors such as the transient receptor potential ion channel Trpm6 and the toll-like receptor Tlr8; signal transducers such as Wnt2b; enzymes such as the 5-phosphatase Inpp5j; and transcription factors such as Tox2 (**Figure 5G**). Importantly, these results highlight the strong decoupling between translational and transcriptional regulation in cells. Thus, our results indicate a differential mRNA association to ribosomes at single transcript level, conditioned by HTT-ribosome interaction. Altogether, these data support the hypothesis that HTT regulates the translation of a specific subset of mRNAs.

HTT regulates Tox2 expression at the translational level

We then asked whether HTT modulates axon regeneration through the control of specific protein translation in RGC. First, we used RT-qPCR on FACS-isolated RGC (**Figure S5C**) to compare the total level of target mRNAs between Pten/HTT-deleted and Pten-deleted conditions at 3dpc. In parallel, we analysed the level of ribosome-associated target mRNAs in RGC, using ribosome immunoprecipitation with RPL22-flag (**Figure S5D-F**). We isolated RNA from the immunoprecipitated fraction (**Figure**

S5G) and used RT-qPCR to compare the level of ribosome-associated mRNAs between Pten/HTT-deleted and Pten-deleted conditions at 3dpc. Using this approach, we validated several translational targets that are differentially associated to ribosomes in RGC upon HTT deletion, while their total mRNA level is unchanged, e.g. *Trarg1*, *Tox2* and *Wnt2b* (**Figure 5H, I, Figure S5H**). These results are consistent with results from HTT-deleted versus control MEF. Conversely, no difference was found for several mRNAs that are regulated neither at the total nor at the ribosome-associated level, e.g. *Tubb3* and *Pex19* (**Figure S5H**). These results confirm the relevance of our in vitro dataset to injured RGC.

Next, we focused on one of the translational targets of HTT, *Tox2* (thymocyte selection-associated HMG-box) transcription factor (**Figure 5G**). *Tox* was previously shown to regulate corticogenesis by promoting division of neural progenitors and neurite outgrowth, via promotor binding of key genes such as *Sox2*, *Robo2*, and members of the *Shh*, *Wnt* and *Notch* signaling pathways³³. *Tox* family members participate in the transcriptional architecture of interneurons in the developing cortex³⁴. In the context of neuronal circuit repair, these features make the *Tox* family member *Tox2* a relevant candidate for further analysis of axon regeneration.

Our data reveal that *Tox2* mRNA is differentially associated with ribosomes upon HTT deletion, but not transcriptionally regulated (**Figure 5G**). In situ hybridization revealed that *Tox2* is expressed in mature RGC (**Figure S5I**). Furthermore, we found no difference in *Tox2* mRNA level when comparing Pten-deleted and Pten/HTT-deleted RGC, in intact condition and at 3dpc (**Figure S5J, K**). Using RT-qPCR on FACS-isolated RGC, we found no difference in the level of *Tox2* mRNA between Pten/HTT-deleted and Pten-deleted conditions at 3dpc (**Figure 5H**). Conversely, using RT-qPCR on ribosome-associated mRNA, we found a differential association of *Tox2* mRNA to ribosomes in absence of HTT, comparing Pten/HTT-deleted and Pten-deleted conditions at 3dpc (**Figure 5I**), which was not the case of *Gapdh*. From these data, we concluded that HTT is a translational regulator of *Tox2* mRNA target in RGC.

To determine how HTT regulates *Tox2* translation, we performed polysome profiling on MEF. Using ultracentrifugation on a sucrose gradient, mRNA species were separated according to the number of ribosomes that they carry. Lighter fractions contain untranslated or slowly translated mRNAs, while heavier fractions contain actively translated mRNAs (**Figure 6A**). We compared HTT-deleted versus control MEF and assessed the distribution of *Tox2* mRNA in monosomes (slow or no translation), light polysomes (medium translation) and heavy polysomes (fast, active translation)^{35,36}. Interestingly, we found that the deletion of HTT caused the distribution of *Tox2* mRNA to shift from the fast, active translation fractions towards the slow to no-translation fractions, while we saw no difference for the control mRNA *Gapdh* (**Figure 6B**). HTT deletion caused a significant increase of *Tox2* mRNA in the monosomal fractions. Conversely, we found a significant decrease of *Tox2* mRNA in the polysomal fractions, where mRNAs are actively translated (**Figure 6C**). Thus, this experiment shows that *Tox2* is less actively translated in absence of HTT, hence that HTT positively regulates *Tox2* translation.

To confirm this result in RGC, we set up a puromycin-proximity ligation assay (puro-PLA) in vivo, which allows to detect nascent *Tox2* protein (**Figure S6A-C, Figure 6D**). In intact condition, we found no significant difference in puromycin-*Tox2* and in puromycin-*Gapdh* PLA-positive events, when comparing Pten-deleted and Pten/HTT-deleted RGC (**Figure 6E-G**). However, when comparing Pten-deleted and Pten/HTT-deleted RGC at 3dpc, we found that the number of new *Tox2* protein synthesis events was significantly lower in RGC in absence of HTT, down to control level (**Figure 6H, I**). Conversely, the number of new *Gapdh* protein synthesis events was unchanged in absence of HTT, but was significantly lower in control condition (Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap 3dpc) (**Figure 6J**). This was the case already at 1dpc (**Figure S6D-F**). Altogether, our data show that HTT deletion in RGC decreases the level of new *Tox2* protein synthesis, in contrast to the level of global translation that is unchanged

(**Figure 4F**). This effect is not seen in intact RGC, but is specific to injured condition. This demonstrates that HTT selectively controls Tox2 protein synthesis in injured RGC.

Translationally regulated target of HTT Tox2 controls axon regeneration

To investigate whether Tox2 is implicated in HTT-mediated axon regeneration, we modulated Tox2 expression and assessed the effects in terms of axon regeneration at 14dpc. First, we used an shRNA directed against Tox2 (shTox2) (**Figure S6B, C**) and expressed it using AAV2 injection together with AAV2-Cre injection in Pten^{fl/fl} mice (**Figure 7A**). This way, we knocked down Tox2 expression in Pten-deleted RGC. Strikingly, we found that Tox2 knock-down suppresses axon regeneration at 14dpc (**Figure 7A, B**), which phenocopies HTT deletion in the same paradigm of regeneration (**Figure 1E, F**). Similarly to HTT deletion, the extent of RGC survival was unchanged (**Figure S7A, B**). We also found that pS6 protein levels were unchanged by Tox2 knock-down (**Figure S7A, C**), again showing that the suppression of the regenerative effect is not due to an alteration of the mTOR pathway.

Conversely, we overexpressed Tox2 in Pten/HTT-deleted RGC, using co-injection of AAV2-Cre+AAV2-Tox2 in Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl} mice (**Figure 7C**). We did so by cloning Tox2 coding sequence in the AAV vector backbone under the CMV promoter. This way, we circumvented any contribution of regulatory untranslated regions in *Tox2* mRNA. As controls, we injected AAV2-Cre+AAV2-Plap in Pten^{fl/fl} and Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl} mice. As expected, Pten/HTT-deleted RGC showed very little regeneration compared to Pten-deleted RGC (AAV2-Plap injection). On the other hand, Tox2 overexpression significantly rescued axon regeneration in Pten/HTT-deleted RGC (**Figure 7C, D**). With an efficient overexpression of Tox2 under the CMV promoter, Tox2 protein synthesis is increased, regardless of the translation regulation process normally occurring in the cell, and thus produces robust regeneration even in Pten/HTT-deleted condition. We also tested the effect of Tox2 overexpression in WT mice and found no difference in terms of regeneration (**Figure S7D, E**), of survival or pS6 expression (**Figure S7F-H**). This result suggests that Tox2 alone is not sufficient to promote axon regeneration, but is necessary in the Pten-deleted paradigm. Analysis of Tox2 protein expression revealed a strong decrease in Pten/HTT-deleted RGC in response to injury. Conversely, this drop is contained in Pten-deleted RGC, where HTT expression is stable even at a late timepoint after injury (14dpc) (**Figure S7I**).

Altogether, our experiments provide evidence that HTT is a ribosome-associated factor that controls axon regeneration via the translational regulation of specific mRNAs such as *Tox2*. In the paradigm of mTOR-induced axon regeneration, the deletion of HTT or of its translationally-regulated mRNA target abolishes the regenerative effect. Conversely, overexpression of the translationally-regulated target leads to increased protein synthesis of this specific target, regardless of its normal translation regulation, and rescues the regenerative phenotype after CNS injury (**Figure 7E**).

Discussion

CNS axon regeneration is a multimodal process that involves different layers of regulation. Gene expression, through epigenetic and transcriptional regulation, has been extensively studied in this context^{3,37}. Importantly, robust axon regeneration can be triggered by activating molecular pathways that are master regulators of several steps of protein synthesis, such as mTOR^{4,38} and c-myc, which is directly involved in the regulation of the translational complex and protein synthesis^{7,39}. Yet, to which extent protein translation is critical to achieve axonal growth and functional recovery remains largely unknown. In our study, we highlight for the first time that the process of mRNA-specific translation,

coordinated by the functional interaction of specific factors with ribosomes, controls axon regeneration. We identify HTT as such a key regulatory factor whose functional association to ribosomes conditions neuronal regenerative response to injury. Through its interaction with ribosomes, HTT controls the translation of a specific subset of mRNAs, including *Tox2*. The translational selectivity driven by HTT is specific to the regenerative condition following injury. More generally, we show that specific translational control is as important as transcriptional control to promote axon regeneration. Through identification of this new regulatory mechanism, our study unravels candidate mRNAs whose selective translation coordinated by HTT are key for axon regeneration of injured neurons.

Our data provide multiple pieces of evidence for a strong, mRNA-independent interaction of HTT with ribosomes, which confirm previous screens of HTT interactants in the brain that revealed several ribosomal proteins, both from the small and the large subunit^{28,40}. We identify a new physiological function for wild-type HTT: the regulation of mRNA-specific translation, but not of global translation. The way HTT mediates mRNA-specific translation may involve binding partners that remain to be identified. Furthermore, our results are in line with findings related to HTT mutation in the context of Huntington's disease. Indeed, the disease-related mutation of HTT may alter its role in protein translation. This is supported by impairment of cap-dependent translation by overexpression of mutant HTT *in vitro*⁴¹. Two recent studies showed that mutant HTT impairs global protein synthesis, either up by altering the activity of translation factors such as 4E-BP⁴² or down by stalling ribosomes on mRNA⁴³.

In our study we show that HTT customizes ribosomes, which results in differential mRNA association to ribosomes and translation. More generally, ribosome-interacting factors stand as novel keys of translational regulation, directly influencing the functional outcome of mRNA translation depending on the physio-pathological context⁴⁴. It is now well described that the translational complex is not an invariant unit and that its composition – and notably the differential association of translation factors to the ribosome – influences gene expression at the translational level¹⁶. The fact that mRNA and protein levels correlate only partially^{45–47} illustrates the necessity of a fine translational regulation to maintain cell homeostasis and adapt its response to a stress or an external stimulus. Translation-associated factors stand as critical regulators of gene expression, thereby building the developmental program for cell specification and tissue organization⁴⁸. In addition, functional interactants of the ribosome, namely the ribo-interactome, remain to be clearly characterized. So far, only few studies have explored the functional interaction between associated factors and ribosomes^{49,50}. Using endogenous tagging of ribosomal proteins, Simsek and colleagues provided an exhaustive description of the ribo-interactome in mouse embryonic stem cells⁴⁴. On top of the canonical components of the translation machinery, they identified more than 300 ribosome-associated proteins, as well as post-translational modifications that contribute to ribosome customization. Yet, this interactome that shapes ribosome diversity may well be specific to a particular developmental stage, cell type or stress response^{51–53}. In the next years, the increasing sensitivity of proteomic techniques will allow to clearly describe the diversity of ribosomes in different neuronal subpopulations, in the context of neuronal injury response, neuroprotection and axon regeneration.

Furthermore, much effort is made to understand how variations in the composition of the translational complex lead to a switch in gene expression that causes pathological defects. In the case of ribosomopathies, a ribosomal protein or a factor necessary for ribosome biogenesis is mutated, leading to a defective structure and/or function of the ribosome⁵⁴. In cancer cells, dysregulated activity of translation initiation factors results in higher translation of oncogenic factors^{55–57}, but the impairment of translational control may involve a broader remodelling of the whole translational machinery⁵⁸. In the context of CNS injury, our work highlights for the first time that translational regulation through customization of the translational machinery is at play to control axon regeneration. Whether this

selective translation process displays differential activity in subcellular domains (e.g. cell soma versus axon shaft versus growth cone) will be the next key question to address. Indeed, how local protein synthesis influences CNS axon regeneration raises much attention⁵⁹, based on studies in embryonic neurons and in PNS neurons⁶⁰⁻⁶⁴. In addition, the increasing resolution of imaging techniques has recently allowed to detect the translational complex in pre-synaptic compartments of the intact adult CNS axons^{65,66}. Therefore, our work opens the path to explore the role of translational control in CNS regeneration.

The selectivity of the translational complex for certain mRNA pools relies on the presence of cis-regulatory elements in the transcript sequence⁶⁷⁻⁷⁰. These regulatory regions include internal ribosome entry sites (IRES) elements in the 5' untranslated region (5'UTR) of the mRNA. Initially described in viruses, IRES have been identified in more than 100 mammalian mRNAs, for example in *c-myc*^{71,72} and *p53*⁷³, two transcription factors implicated in axon regeneration^{7,74}. The composition of the translational complex is key to promote IRES-dependent mRNA translation, as reported for ribosomal protein RPL38-containing ribosomes that control Hox gene expression during development^{75,76}. As there is no canonical IRES structure, no canonical IRES co-factors could be identified. Other regulatory elements of mRNA selectivity are upstream open reading frames (uORFs). Translation of uORFs has been shown to regulate tissue patterning⁷⁷ and stress response⁷⁸. 5' Terminal OligoPyrimidine (5'TOP) motifs also allow translational control in stress conditions, and are found in mRNAs encoding ribosomal proteins and translation factors themselves⁶⁹. In addition, beside their role in target mRNA degradation, microRNAs can directly control protein synthesis, through inhibition of the initiation step by repressing cap-dependent translation or by preventing ribosomal subunit assembly⁷⁹. Such cis-regulatory elements mediate mRNA translation at the steps of mRNA identification by the ribosome, recruitment and initiation.

In our case, HTT may directly promote the recruitment of specific mRNAs by mechanisms like 5'UTR- or IRES-mediated regulation, although this remains to be determined. Besides, HTT may participate in translation regulation at different steps, either directly or by influencing the activity of an intermediate translational partner. Interestingly, HTT interacts with both small and large subunits of ribosomes. In addition, *Tox2* mRNA relocates in the monosomal fraction in absence of HTT. The ribosome density on a particular transcript correlates with its translation efficiency⁸⁰. Not only does this depend on the rate of translation initiation, but it also depends on how fast a firstly-loaded ribosome will translate a transcript during the elongation phase to allow loading of more ribosomes. On the other hand, recent work in adult neurons has demonstrated an unexpected translational activity of monosomes, which actively translate synapse-associated mRNAs in physiological conditions⁸¹. Beyond the translational regulatory state, specific subsets of mRNAs may be actively translated in monosomal fractions. Our results suggest a regulatory role of HTT in selective translation, with the two pieces of evidence that, in absence of HTT, (i) *Tox2* mRNA relocates in the monosomal fraction in vitro and (ii) *Tox2* protein is less synthesized in injured RGC. The steps of translational regulation involved remain to be identified, as well as the precise mechanism by which HTT mediates mRNA-specific translation.

Enhancing selective translation rather than global translation may be more relevant to express efficiently pro-regenerative molecules in order to repair functionally a neuronal circuit. Indeed, despite major advances in achieving long-distance regeneration in the past decade^{7,25,82}, no functional recovery has been obtained yet. Importantly, this massive extent of axon regeneration relies on modulation of transcription- and translation-promoting pathways that may be oncogenic, and therefore currently inapplicable as a therapy. Therefore, elucidating HTT mechanism of action as a pro-regenerative factor may allow to better tackle neuronal injury response and trigger functional CNS axon regeneration.

To conclude, we show that translational regulation, independently of transcriptional regulation, is a critical step to achieve CNS regeneration. Upon injury, ribosome customization through association of factors such as HTT, switches the translational landscape from a regeneration-primed to a regeneration-incompetent state. Altogether, our study allows to (i) identify a molecular mechanism of control of axon regeneration; (ii) highlight pro-regenerative targets of CNS axon regeneration regulated at the translational level; and (iii) develop novel therapeutic strategies, based on the modulation of translation-associated factors such as HTT, to enhance selective translation of such pro-regenerative targets.

References

1. Filbin, M.T. (2003). Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci* 4, 703–713. 10.1038/nrn1195.
2. Silver, J., and Miller, J.H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 146–156. 10.1038/nrn1326.
3. He, Z., and Jin, Y. (2016). Intrinsic Control of Axon Regeneration. *Neuron* 90, 437–451. 10.1016/j.neuron.2016.04.022.
4. Park, K.K., Liu, K., Hu, Y., Smith, P.D., Wang, C., Cai, B., Xu, B., Connolly, L., Kramvis, I., Sahin, M., et al. (2008). Promoting Axon Regeneration in the Adult CNS by Modulation of the PTEN/mTOR Pathway. *Science* 322, 963–966. 10.1126/science.1161566.
5. Moore, D.L., Blackmore, M.G., Hu, Y., Kaestner, K.H., Bixby, J.L., Lemmon, V.P., and Goldberg, J.L. (2009). KLF Family Members Regulate Intrinsic Axon Regeneration Ability. *Science* 326, 298–301. 10.1126/science.1175737.
6. Smith, P.D., Sun, F., Park, K.K., Cai, B., Wang, C., Kuwako, K., Martinez-Carrasco, I., Connolly, L., and He, Z. (2009). SOCS3 deletion promotes optic nerve regeneration in vivo. *Neuron* 64, 617–623. 10.1016/j.neuron.2009.11.021.
7. Belin, S., Nawabi, H., Wang, C., Tang, S., Latremoliere, A., Warren, P., Schorle, H., Uncu, C., Woolf, C., He, Z., et al. (2015). Injury-induced decline of intrinsic regenerative ability revealed by quantitative proteomics. *Neuron* 86, 1000–1014. 10.1016/j.neuron.2015.03.060.
8. Jacobi, A., Tran, N.M., Yan, W., Benhar, I., Tian, F., Schaffer, R., He, Z., and Sanes, J.R. (2022). Overlapping transcriptional programs promote survival and axonal regeneration of injured retinal ganglion cells. *Neuron*, S0896-6273(22)00540-2. 10.1016/j.neuron.2022.06.002.
9. Tian, F., Cheng, Y., Zhou, S., Wang, Q., Monavarfeshani, A., Gao, K., Jiang, W., Kawaguchi, R., Wang, Q., Tang, M., et al. (2022). Core transcription programs controlling injury-induced neurodegeneration of retinal ganglion cells. *Neuron*, S0896-6273(22)00541-4. 10.1016/j.neuron.2022.06.003.
10. Sun, F., Park, K.K., Belin, S., Wang, D., Lu, T., Chen, G., Zhang, K., Yeung, C., Feng, G., Yankner, B.A., et al. (2011). Sustained axon regeneration induced by co-deletion of PTEN and SOCS3. *Nature* 480, 372–375. 10.1038/nature10594.
11. Poplawski, G.H.D., Kawaguchi, R., Van Niekerk, E., Lu, P., Mehta, N., Canete, P., Lie, R., Dragatsis, I., Meves, J.M., Zheng, B., et al. (2020). Injured adult neurons regress to an embryonic transcriptional growth state. *Nature* 581, 77–82. 10.1038/s41586-020-2200-5.
12. Saudou, F., and Humbert, S. (2016). The Biology of Huntingtin. *Neuron* 89, 910–926. 10.1016/j.neuron.2016.02.003.

13. M'Barek, K.B., Pla, P., Orvoen, S., Benstaali, C., Godin, J.D., Gardier, A.M., Saudou, F., David, D.J., and Humbert, S. (2013). Huntingtin Mediates Anxiety/Depression-Related Behaviors and Hippocampal Neurogenesis. *J. Neurosci.* *33*, 8608–8620. 10.1523/JNEUROSCI.5110-12.2013.
14. Liot, G., Zala, D., Pla, P., Mottet, G., Piel, M., and Saudou, F. (2013). Mutant Huntingtin Alters Retrograde Transport of TrkB Receptors in Striatal Dendrites. *J. Neurosci.* *33*, 6298–6309. 10.1523/JNEUROSCI.2033-12.2013.
15. Sawai, H., Clarke, D.B., Kittlerova, P., Bray, G.M., and Aguayo, A.J. (1996). Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-4/5 Stimulate Growth of Axonal Branches from Regenerating Retinal Ganglion Cells. *J Neurosci* *16*, 3887–3894. 10.1523/JNEUROSCI.16-12-03887.1996.
16. Xue, S., and Barna, M. (2012). Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* *13*, 355–369. 10.1038/nrm3359.
17. Maier, T., Güell, M., and Serrano, L. (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Letters* *583*, 3966–3973. 10.1016/j.febslet.2009.10.036.
18. Marques Sousa, C., and Humbert, S. (2013). Huntingtin: Here, There, Everywhere! *Journal of Huntington's Disease* *2*, 395–403. 10.3233/JHD-130082.
19. Dragatsis, I., Levine, M.S., and Zeitlin, S. (2000). Inactivation of *Hdh* in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nature Genetics* *26*, 300–306. 10.1038/81593.
20. Rodriguez, A.R., de Sevilla Müller, L.P., and Brecha, N.C. (2014). The RNA binding protein RBPMS is a selective marker of ganglion cells in the mammalian retina. *J Comp Neurol* *522*, 1411–1443. 10.1002/cne.23521.
21. Sarbassov, D.D., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology* *17*, 596–603. 10.1016/j.ceb.2005.09.009.
22. Colin, E., Zala, D., Liot, G., Rangone, H., Borrell-Pagès, M., Li, X.-J., Saudou, F., and Humbert, S. (2008). Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *EMBO J* *27*, 2124–2134. 10.1038/emboj.2008.133.
23. Gauthier, L.R., Charrin, B.C., Borrell-Pagès, M., Dompierre, J.P., Rangone, H., Cordelières, F.P., De Mey, J., MacDonald, M.E., Leßmann, V., Humbert, S., et al. (2004). Huntingtin Controls Neurotrophic Support and Survival of Neurons by Enhancing BDNF Vesicular Transport along Microtubules. *Cell* *118*, 127–138. 10.1016/j.cell.2004.06.018.
24. Thion, M.S., McGuire, J.R., Sousa, C.M., Fuhrmann, L., Fitamant, J., Leboucher, S., Vacher, S., du Montcel, S.T., Bièche, I., Bernet, A., et al. (2015). Unraveling the Role of Huntingtin in Breast Cancer Metastasis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* *107*, djv208. 10.1093/jnci/djv208.
25. Lim, J.-H.A., Stafford, B.K., Nguyen, P.L., Lien, B.V., Wang, C., Zukor, K., He, Z., and Huberman, A.D. (2016). Neural activity promotes long distance, target-specific regeneration of adult retinal axons. *Nat Neurosci* *19*, 1073–1084. 10.1038/nn.4340.
26. Schaeffer, J., Delpèch, C., Albert, F., Belin, S., and Nawabi, H. (2020). Adult Mouse Retina Explants: From ex vivo to in vivo Model of Central Nervous System Injuries. *Front. Mol. Neurosci.* *13*. 10.3389/fnmol.2020.599948.
27. Anne, S.L., Saudou, F., and Humbert, S. (2007). Phosphorylation of Huntingtin by Cyclin-Dependent Kinase 5 Is Induced by DNA Damage and Regulates Wild-Type and Mutant

- Huntingtin Toxicity in Neurons. *J Neurosci* 27, 7318–7328. 10.1523/JNEUROSCI.1831-07.2007.
28. Shirasaki, D.I., Greiner, E.R., Al-Ramahi, I., Gray, M., Boonthueung, P., Geschwind, D.H., Botas, J., Coppola, G., Horvath, S., Loo, J.A., et al. (2012). Network Organization of the Huntingtin Proteomic Interactome in Mammalian Brain. *Neuron* 75, 41–57. 10.1016/j.neuron.2012.05.024.
 29. Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., et al. (2019). STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res* 47, D607–D613. 10.1093/nar/gky1131.
 30. Belin, S., Hacot, S., Daudignon, L., Therizols, G., Pourpe, S., Mertani, H.C., Rosa-Calatrava, M., and Diaz, J.-J. (2010). Purification of Ribosomes from Human Cell Lines. *Current Protocols in Cell Biology* 49, 3.40.1–3.40.11. 10.1002/0471143030.cb0340s49.
 31. Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2009). Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell* 136, 731–745. 10.1016/j.cell.2009.01.042.
 32. Gerashchenko, M.V., and Gladyshev, V.N. (2017). Ribonuclease selection for ribosome profiling. *Nucleic Acids Res* 45, e6. 10.1093/nar/gkw822.
 33. Artegiani, B., de Jesus Domingues, A.M., Bragado Alonso, S., Brandl, E., Massalini, S., Dahl, A., and Calegari, F. (2015). Tox: a multifunctional transcription factor and novel regulator of mammalian corticogenesis. *The EMBO Journal* 34, 896–910. 10.15252/embj.201490061.
 34. Paul, A., Crow, M., Raudales, R., He, M., Gillis, J., and Huang, Z.J. (2017). Transcriptional Architecture of Synaptic Communication Delineates GABAergic Neuron Identity. *Cell* 171, 522–539.e20. 10.1016/j.cell.2017.08.032.
 35. Gandin, V., Sikström, K., Alain, T., Morita, M., McLaughlan, S., Larsson, O., and Topisirovic, I. (2014). Polysome Fractionation and Analysis of Mammalian Translatomes on a Genome-wide Scale. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, e51455. 10.3791/51455.
 36. Warner, J.R., Knopf, P.M., and Rich, A. (1963). A MULTIPLE RIBOSOMAL STRUCTURE IN PROTEIN SYNTHESIS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 49, 122–129.
 37. Mahar, M., and Cavalli, V. (2018). Intrinsic mechanisms of neuronal axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* 19, 323–337. 10.1038/s41583-018-0001-8.
 38. Liu, G.Y., and Sabatini, D.M. (2020). mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1–21. 10.1038/s41580-019-0199-y.
 39. van Riggelen, J., Yetil, A., and Felsher, D.W. (2010). MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat Rev Cancer* 10, 301–309. 10.1038/nrc2819.
 40. Sap, K.A., Guler, A.T., Bury, A., Dekkers, D., Demmers, J.A.A., and Reits, E.A. (2021). Identification of Full-Length Wild-Type and Mutant Huntingtin Interacting Proteins by Crosslinking Immunoprecipitation in Mice Brain Cortex. *Journal of Huntington’s Disease Preprint*, 1–13. 10.3233/JHD-210476.
 41. Culver, B.P., Savas, J.N., Park, S.K., Choi, J.H., Zheng, S., Zeitlin, S.O., Yates, J.R., and Tanese, N. (2012). Proteomic Analysis of Wild-type and Mutant Huntingtin-associated Proteins in Mouse Brains Identifies Unique Interactions and Involvement in Protein Synthesis. *J Biol Chem* 287, 21599–21614. 10.1074/jbc.M112.359307.
 42. Creus-Muncunill, J., Badillos-Rodríguez, R., Garcia-Forn, M., Masana, M., Garcia-Díaz Barriga, G., Guisado-Corcoll, A., Alberch, J., Malagelada, C., Delgado-García, J.M., Gruart,

- A., et al. (2019). Increased translation as a novel pathogenic mechanism in Huntington's disease. *Brain*. 10.1093/brain/awz230.
43. Eshraghi, M., Karunadharma, P.P., Blin, J., Shahani, N., Ricci, E.P., Michel, A., Urban, N.T., Galli, N., Sharma, M., Ramírez-Jarquín, U.N., et al. (2021). Mutant Huntingtin stalls ribosomes and represses protein synthesis in a cellular model of Huntington disease. *Nature Communications* 12, 1461. 10.1038/s41467-021-21637-y.
 44. Simsek, D., Tiu, G.C., Flynn, R.A., Byeon, G.W., Leppek, K., Xu, A.F., Chang, H.Y., and Barna, M. (2017). The Mammalian Ribo-interactome Reveals Ribosome Functional Diversity and Heterogeneity. *Cell* 169, 1051-1065.e18. 10.1016/j.cell.2017.05.022.
 45. Liu, Y., Beyer, A., and Aebersold, R. (2016). On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell* 165, 535–550. 10.1016/j.cell.2016.03.014.
 46. Komili, S., and Silver, P.A. (2008). Coupling and coordination in gene expression processes: a systems biology view. *Nature Reviews Genetics* 9, 38–48. 10.1038/nrg2223.
 47. Vogel, C., and Marcotte, E.M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* 13, 227–232. 10.1038/nrg3185.
 48. Fujii, K., Zhulyun, O., Byeon, G.W., Genuth, N.R., Kerr, C.H., Walsh, E.M., and Barna, M. (2021). Controlling tissue patterning by translational regulation of signaling transcripts through the core translation factor eIF3c. *Developmental Cell* 56, 2928-2937.e9. 10.1016/j.devcel.2021.10.009.
 49. Darnell, J.C., Van Driesche, S.J., Zhang, C., Hung, K.Y.S., Mele, A., Fraser, C.E., Stone, E.F., Chen, C., Fak, J.J., Chi, S.W., et al. (2011). FMRP Stalls Ribosomal Translocation on mRNAs Linked to Synaptic Function and Autism. *Cell* 146, 247–261. 10.1016/j.cell.2011.06.013.
 50. Kim, H.D., Kong, E., Kim, Y., Chang, J.-S., and Kim, J. (2017). RACK1 depletion in the ribosome induces selective translation for non-canonical autophagy. *Cell Death & Disease* 8, e2800–e2800. 10.1038/cddis.2017.204.
 51. Genuth, N.R., and Barna, M. (2018). The discovery of ribosome heterogeneity and its implications for gene regulation and organismal life. *Mol Cell* 71, 364–374. 10.1016/j.molcel.2018.07.018.
 52. Guo, H. (2018). Specialized ribosomes and the control of translation. *Biochemical Society Transactions* 46, 855–869. 10.1042/BST20160426.
 53. Shi, Z., and Barna, M. (2015). Translating the Genome in Time and Space: Specialized Ribosomes, RNA Regulons, and RNA-Binding Proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 31, 31–54. 10.1146/annurev-cellbio-100814-125346.
 54. Gay, D.M., Lund, A.H., and Jansson, M.D. (2021). Translational control through ribosome heterogeneity and functional specialization. *Trends in Biochemical Sciences* 0. 10.1016/j.tibs.2021.07.001.
 55. Lee, L.J., Papadopoli, D., Jewer, M., del Rincon, S., Topisirovic, I., Lawrence, M.G., and Postovit, L.-M. (2021). Cancer Plasticity: The Role of mRNA Translation. *Trends in Cancer* 7, 134–145. 10.1016/j.trecan.2020.09.005.
 56. de la Parra, C., Walters, B.A., Geter, P., and Schneider, R.J. (2018). Translation initiation factors and their relevance in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 48, 82–88. 10.1016/j.gde.2017.11.001.
 57. Robichaud, N., Sonenberg, N., Ruggero, D., and Schneider, R.J. (2019). Translational Control in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11, a032896. 10.1101/cshperspect.a032896.

58. Ho, J.J.D., Cunningham, T.A., Manara, P., Coughlin, C.A., Arumov, A., Roberts, E.R., Osteen, A., Kumar, P., Bilbao, D., Krieger, J.R., et al. (2021). Proteomics reveal cap-dependent translation inhibitors remodel the translation machinery and translome. *Cell Reports* 37, 109806. 10.1016/j.celrep.2021.109806.
59. Schaeffer, J., and Belin, S. (2021). Axonal protein synthesis in central nervous system regeneration: is building an axon a local matter? *Neural Regen Res* 17, 987–988. 10.4103/1673-5374.324835.
60. Jung, H., Yoon, B.C., and Holt, C.E. (2012). Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair. *Nat Rev Neurosci* 13, 308–324. 10.1038/nrn3210.
61. Verma, P., Chierzi, S., Codd, A.M., Campbell, D.S., Meyer, R.L., Holt, C.E., and Fawcett, J.W. (2005). Axonal Protein Synthesis and Degradation Are Necessary for Efficient Growth Cone Regeneration. *J Neurosci* 25, 331–342. 10.1523/JNEUROSCI.3073-04.2005.
62. Donnelly, C.J., Willis, D.E., Xu, M., Tep, C., Jiang, C., Yoo, S., Schanen, N.C., Kirn-Safran, C.B., van Minnen, J., English, A., et al. (2011). Limited availability of ZBP1 restricts axonal mRNA localization and nerve regeneration capacity. *EMBO J* 30, 4665–4677. 10.1038/emboj.2011.347.
63. Sahoo, P.K., Lee, S.J., Jaiswal, P.B., Alber, S., Kar, A.N., Miller-Randolph, S., Taylor, E.E., Smith, T., Singh, B., Ho, T.S.-Y., et al. (2018). Axonal G3BP1 stress granule protein limits axonal mRNA translation and nerve regeneration. *Nat Commun* 9. 10.1038/s41467-018-05647-x.
64. Koley, S., Rozenbaum, M., Fainzilber, M., and Terenzio, M. (2019). Translating regeneration: Local protein synthesis in the neuronal injury response. *Neuroscience Research* 139, 26–36. 10.1016/j.neures.2018.10.003.
65. Younts, T.J., Monday, H.R., Dudok, B., Klein, M.E., Jordan, B.A., Katona, I., and Castillo, P.E. (2016). Presynaptic protein synthesis is required for long-term plasticity of GABA release. *Neuron* 92, 479–492. 10.1016/j.neuron.2016.09.040.
66. Hafner, A.-S., Donlin-Asp, P.G., Leitch, B., Herzog, E., and Schuman, E.M. (2019). Local protein synthesis is a ubiquitous feature of neuronal pre- and postsynaptic compartments. *Science* 364. 10.1126/science.aau3644.
67. Chen, H.-H., and Tarn, W.-Y. (2019). uORF-mediated translational control: recently elucidated mechanisms and implications in cancer. *RNA Biol* 16, 1327–1338. 10.1080/15476286.2019.1632634.
68. Xue, S., and Barna, M. (2015). Cis-regulatory RNA elements that regulate specialized ribosome activity. *RNA Biol* 12, 1083–1087. 10.1080/15476286.2015.1085149.
69. Cockman, E., Anderson, P., and Ivanov, P. (2020). TOP mRNPs: Molecular Mechanisms and Principles of Regulation. *Biomolecules* 10, 969. 10.3390/biom10070969.
70. Oliveto, S., Mancino, M., Manfrini, N., and Biffo, S. (2017). Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World J Biol Chem* 8, 45–56. 10.4331/wjbc.v8.i1.45.
71. Nanbru, C., Lafon, I., Audigier, S., Gensac, M.C., Vagner, S., Huez, G., and Prats, A.C. (1997). Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site. *J Biol Chem* 272, 32061–32066. 10.1074/jbc.272.51.32061.
72. Stoneley, M., Paulin, F.E., Le Quesne, J.P., Chappell, S.A., and Willis, A.E. (1998). C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene* 16, 423–428. 10.1038/sj.onc.1201763.

73. Ray, P.S., Grover, R., and Das, S. (2006). Two internal ribosome entry sites mediate the translation of p53 isoforms. *EMBO Rep* 7, 404–410. 10.1038/sj.embor.7400623.
74. Di Giovanni, S., Knights, C.D., Rao, M., Yakovlev, A., Beers, J., Catania, J., Avantaggiati, M.L., and Faden, A.I. (2006). The tumor suppressor protein p53 is required for neurite outgrowth and axon regeneration. *EMBO J* 25, 4084–4096. 10.1038/sj.emboj.7601292.
75. Kondrashov, N., Pusic, A., Stumpf, C.R., Shimizu, K., Hsieh, A.C., Xue, S., Ishijima, J., Shiroishi, T., and Barna, M. (2011). Ribosome-Mediated Specificity in Hox mRNA Translation and Vertebrate Tissue Patterning. *Cell* 145, 383–397. 10.1016/j.cell.2011.03.028.
76. Xue, S., Tian, S., Fujii, K., Kladwang, W., Das, R., and Barna, M. (2015). RNA regulons in Hox 5'UTRs confer ribosome specificity to gene regulation. *Nature* 517, 33–38. 10.1038/nature14010.
77. Alghoul, F., Laure, S., Eriani, G., and Martin, F. (2021). Translation inhibitory elements from Hoxa3 and Hoxa11 mRNAs use uORFs for translation inhibition. *eLife* 10, e66369. 10.7554/eLife.66369.
78. Zhou, J., Wan, J., Shu, X.E., Mao, Y., Liu, X.-M., Yuan, X., Zhang, X., Hess, M.E., Brüning, J.C., and Qian, S.-B. (2018). N6-Methyladenosine Guides mRNA Alternative Translation during Integrated Stress Response. *Molecular Cell* 69, 636-647.e7. 10.1016/j.molcel.2018.01.019.
79. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9, 102–114. 10.1038/nrg2290.
80. Li, G.-W., Burkhardt, D., Gross, C., and Weissman, J.S. (2014). Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources. *Cell* 157, 624–635. 10.1016/j.cell.2014.02.033.
81. Biever, A., Glock, C., Tushev, G., Ciirdaeva, E., Dalmay, T., Langer, J.D., and Schuman, E.M. (2020). Monosomes actively translate synaptic mRNAs in neuronal processes. *Science* 367, eaay4991. 10.1126/science.aay4991.
82. de Lima, S., Koriyama, Y., Kurimoto, T., Oliveira, J.T., Yin, Y., Li, Y., Gilbert, H.-Y., Fagiolini, M., Martinez, A.M.B., and Benowitz, L. (2012). Full-length axon regeneration in the adult mouse optic nerve and partial recovery of simple visual behaviors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 9149–9154. 10.1073/pnas.1119449109.
83. Groszer, M., Erickson, R., Scripture-Adams, D.D., Lesche, R., Trumpp, A., Zack, J.A., Kornblum, H.I., Liu, X., and Wu, H. (2001). Negative Regulation of Neural Stem/Progenitor Cell Proliferation by the Pten Tumor Suppressor Gene in Vivo. *Science* 294, 2186–2189. 10.1126/science.1065518.
84. Parikh, P., Hao, Y., Hosseinkhani, M., Patil, S.B., Huntley, G.W., Tessier-Lavigne, M., and Zou, H. (2011). Regeneration of axons in injured spinal cord by activation of bone morphogenetic protein/Smad1 signaling pathway in adult neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, E99–E107. 10.1073/pnas.1100426108.
85. Dodt, H.-U., Leischner, U., Schierloh, A., Jährling, N., Mauch, C.P., Deininger, K., Deussing, J.M., Eder, M., Zieglgänsberger, W., and Becker, K. (2007). Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nature Methods* 4, 331–336. 10.1038/nmeth1036.

86. Moret, F., Renaudot, C., Bozon, M., and Castellani, V. (2007). Semaphorin and neuropilin co-expression in motoneurons sets axon sensitivity to environmental semaphorin sources during motor axon pathfinding. *Development* 134, 4491–4501. 10.1242/dev.011452.
87. Zala, D., Hinckelmann, M.-V., Yu, H., Lyra da Cunha, M.M., Liot, G., Cordelières, F.P., Marco, S., and Saudou, F. (2013). Vesicular Glycolysis Provides On-Board Energy for Fast Axonal Transport. *Cell* 152, 479–491. 10.1016/j.cell.2012.12.029.
88. Durkin, M.E., Qian, X., Popescu, N.C., and Lowy, D.R. (2013). Isolation of Mouse Embryo Fibroblasts. *Bio Protoc* 3.
89. Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140. 10.1093/bioinformatics/btp616.
90. Risso, D., Ngai, J., Speed, T.P., and Dudoit, S. (2014). Normalization of RNA-seq data using factor analysis of control genes or samples. *Nat Biotechnol* 32, 896–902. 10.1038/nbt.2931.

Acknowledgements

The authors would like to thank Yohann Couté and Anne-Marie Hesse for critical reading of the manuscript; Jan Warnking and Emmanuel Barbier for access to storage and computing resources; Mylène Pezet for technical assistance with FACS-sorting experiments; Deniz Dalkara for the SNCG promoter-containing backbone plasmid; and Moein Sarhadi for technical assistance with biochemical experiments. This work was supported by grants from ANR to HN (C7H-ANR16C49 and ANR-21-CE16-0008-01) and SB (ANR-18-CE16-0007 and ANR-21-CE16-0008-02). This work was supported by the French National Research Agency under the “Investissements d’avenir” programme (ANR-17-EURE-0003). HN is supported by NRJ Foundation. SB was supported by a postdoctoral fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) (ARF20150934123). HN and NV are supported by the European Research Council (ERC-St17-759089 to HN). JS is supported by a grant from UNADEV/AVISAN grant (2017 call for proposals “Maladies de la vision, origine et traitement” to FS and HN) and by a postdoctoral fellowship from the FRM (SPF201909009106). This work was supported by the Photonic Imaging Center of Grenoble Institute Neuroscience (Univ Grenoble Alpes – Inserm U1216) which is part of the IsdV core facility and certified by the IbiSA label.

Author contributions

HN and SB designed the project, with input from FS and SH. JS, NV, HN and SB wrote the manuscript, with input from all co-authors. JS was involved in all experiments and analyses. NV performed histology experiments and imaging. JS and EP performed mouse surgeries and perfusions. CD performed mouse surgeries and histology for sciatic nerve injury procedures. BB, NE, CD, BE and AP performed molecular cloning of plasmid constructs, viral vector production and biochemical validation. FC and JJD provided training and equipment for polysome profiling experiments. SH and FS provided HTT mutant mouse lines and tools for molecular biology.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Main Figures

Figure 1

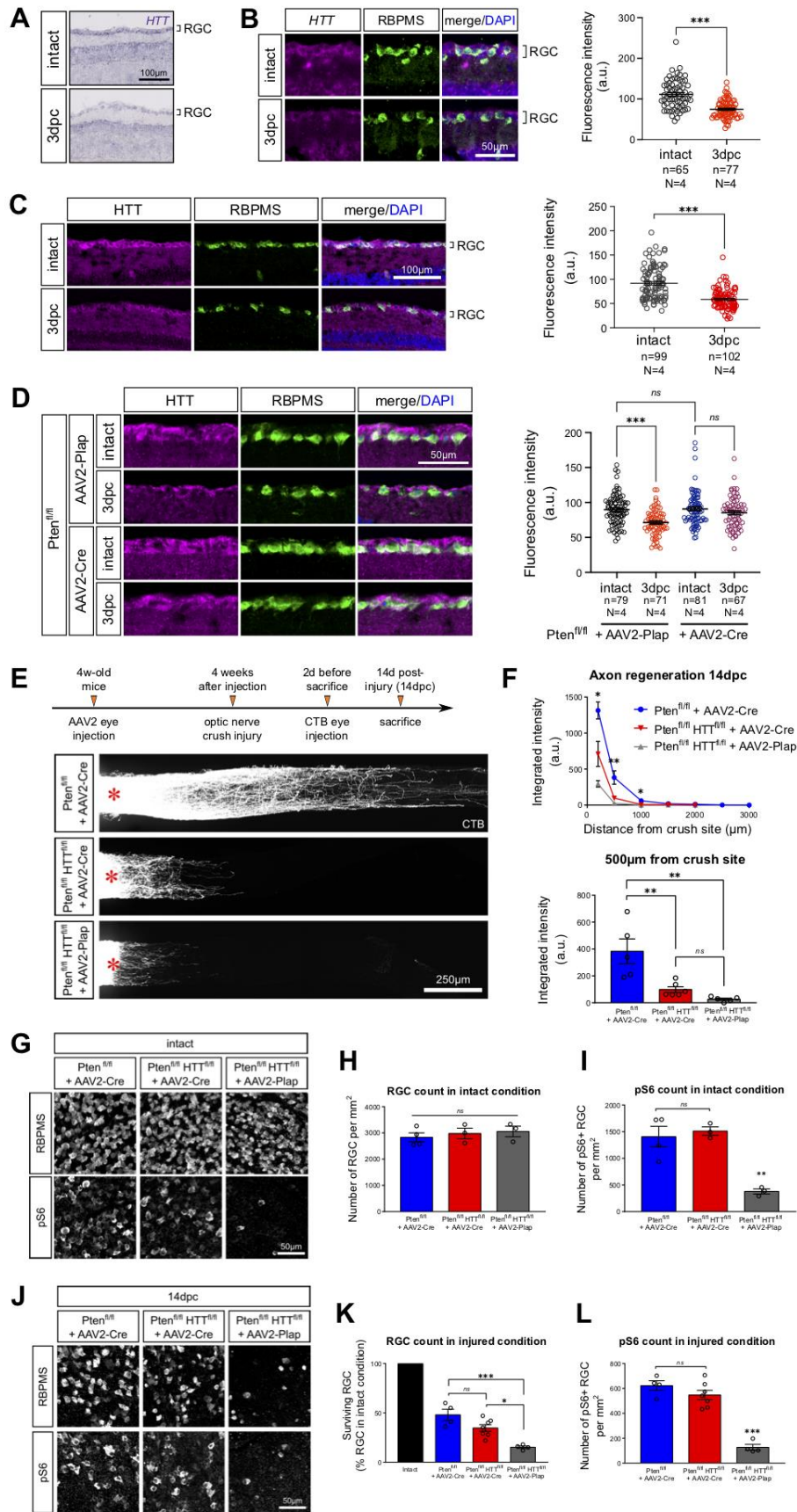


Figure 1: HTT is required for axon regeneration.

(A) In situ hybridization showing *HTT* mRNA expression in the adult retina in intact and injured (3dpc) conditions.

(B) Fluorescent in situ hybridization and quantification of *HTT* mRNA expression in intact and 3dpc RBPMS⁺ RGC. Mann Whitney U-test, ***p-value<0.001.

(C) Immunofluorescence and quantification of HTT protein expression in intact and 3dpc RBPMS⁺ RGC. Mann Whitney U-test, ***p-value<0.001.

(D) Immunofluorescence and quantification showing HTT protein expression in Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre or AAV2-Plap in intact and 3dpc RBPMS⁺ RGC. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, ***p-value<0.001, ns: not significant.

(E) Whole optic nerve confocal images showing CTB⁺ regenerating axons in Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre, Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre and Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap conditions at 14dpc. The injury site is indicated by a red star.

(F) Quantification of integrated fluorescence intensity along the optic nerve. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, *p-value<0.05, **p-value<0.01, ns: not significant. The top graph gives the multiple comparisons test between Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre and Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre conditions.

(G) Whole-mount retina confocal images showing RBPMS⁺ and pS6⁺ RGC in Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre, Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre and Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap intact conditions.

(H) Quantification of RBPMS⁺ RGC per mm² retina. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, ns: not significant.

(I) Quantification of pS6⁺ RGC per mm² retina. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, **p-value<0.01, ns: not significant.

(J) Whole-mount retina confocal images showing RBPMS⁺ and pS6⁺ RGC in Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre, Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre and Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap conditions at 14dpc.

(K) Quantification of RBPMS⁺ RGC as a percentage of intact condition. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, *p-value<0.05, ***p-value<0.001, ns: not significant.

(L) Quantification of pS6⁺ RGC per mm² retina. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, ***p-value<0.001, ns: not significant.

Figure 2

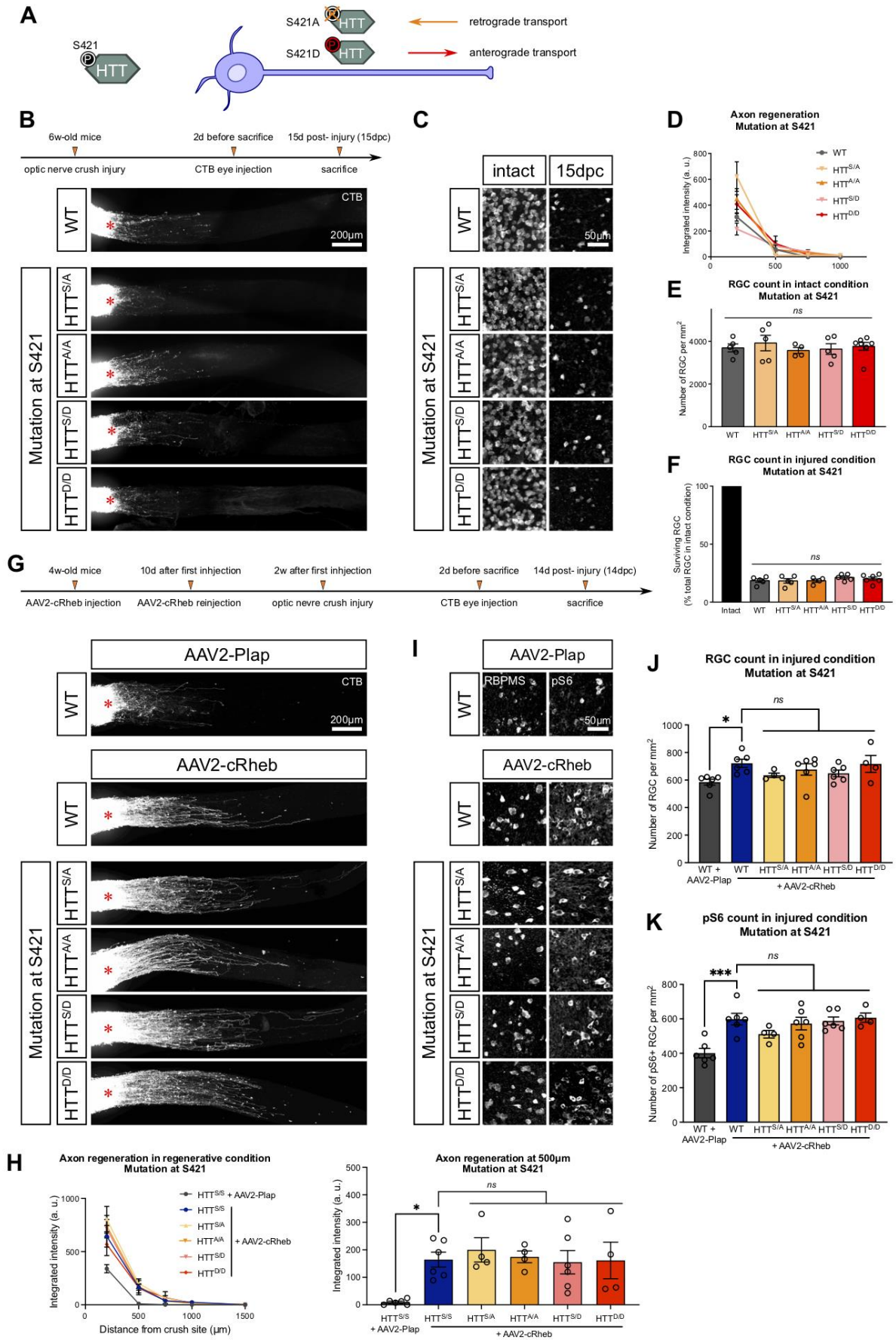


Figure 2: Axon regeneration and RGC survival are not modified by S421 phospho-mutations responsible for HTT-mediated control of BDNF transport.

- (A) Schematic representation of transgenic mouse lines carrying S421 phospho-point mutations^{22,24}.
- (B) Whole optic nerve confocal images showing CTB⁺ regenerating axons in phospho-mutant mouse lines at 15dpc. The injury site is indicated by a red star.
- (C) Whole-mount retina confocal images showing RBPMS⁺ RGC in phospho-mutant mouse lines in intact and 15dpc conditions.
- (D) Quantification of integrated fluorescence intensity along the optic nerve.
- (E) Quantification of RBPMS⁺ RGC per mm² retina in intact condition. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, ns: not significant.
- (F) Quantification of RBPMS⁺ RGC as a percentage of intact RBPMS⁺ RGC. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, ns: not significant.
- (G) Whole optic nerve confocal images showing CTB⁺ regenerating axons in phospho-mutant mouse lines injected with AAV2-cRheb or AAV2-Plap at 14dpc. The injury site is indicated by a red star.
- (H) Quantification of integrated fluorescence intensity along the optic nerve.
- (I) Whole-mount retina confocal images showing RBPMS⁺ and pS6⁺ RGC in phospho-mutant mouse lines injected with AAV2-cRheb or AAV2-Plap at 14dpc.
- (J) Quantification of RBPMS⁺ RGC per mm² retina at 14dpc. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, ns: not significant.
- (K) Quantification of pS6⁺ RGC per mm² retina at 14dpc. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, ns: not significant.

Figure 3

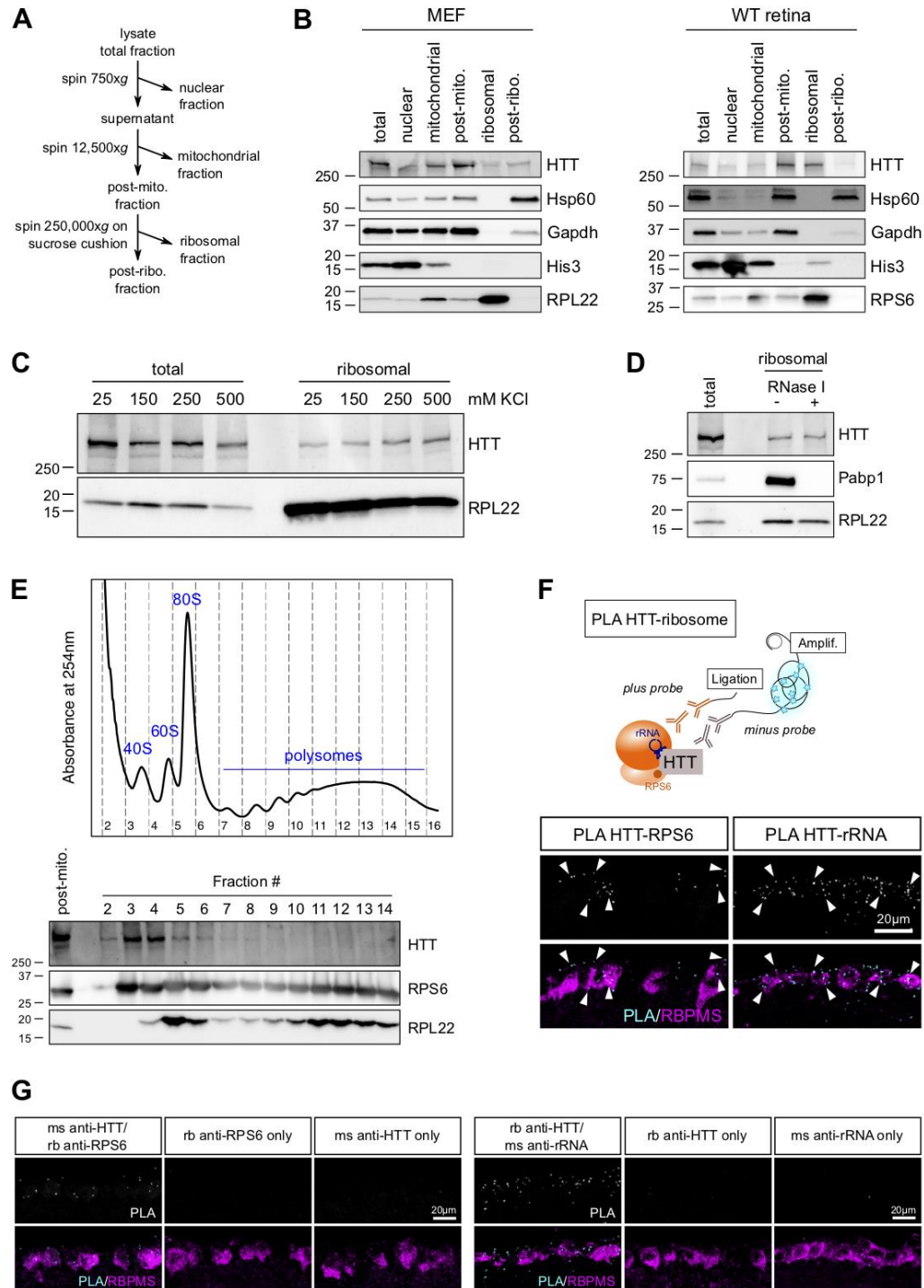


Figure 3: HTT interacts with ribosomes but does not control global translation. (A) Schematic representation of ribosome purification procedure.

(B) Immunoblot of the subcellular fractions from WT MEF lysate and adult WT mouse retina lysate.

- (C) Immunoblot of the total and purified ribosomal fractions of MEF lysate with increasing KCl concentrations.
- (D) Immunoblot of the total and purified ribosomal fractions of MEF lysate, following RNase I treatment of the post-mitochondrial fraction.
- (E) Representative polysome profile of WT MEF on a 15-50% sucrose gradient. Immunoblot showing the presence of HTT in the 40S, 60S, monosome and light polysome fractions.
- (F) Schematic representation of PLA experiment. PLA staining confocal images on retina sections, showing interaction between HTT and RPS6 or rRNA in RGC.
- (G) PLA staining confocal images showing interaction between HTT and RPS6 or rRNA in WT retinas, and controls with individual antibodies alone.

Figure 4

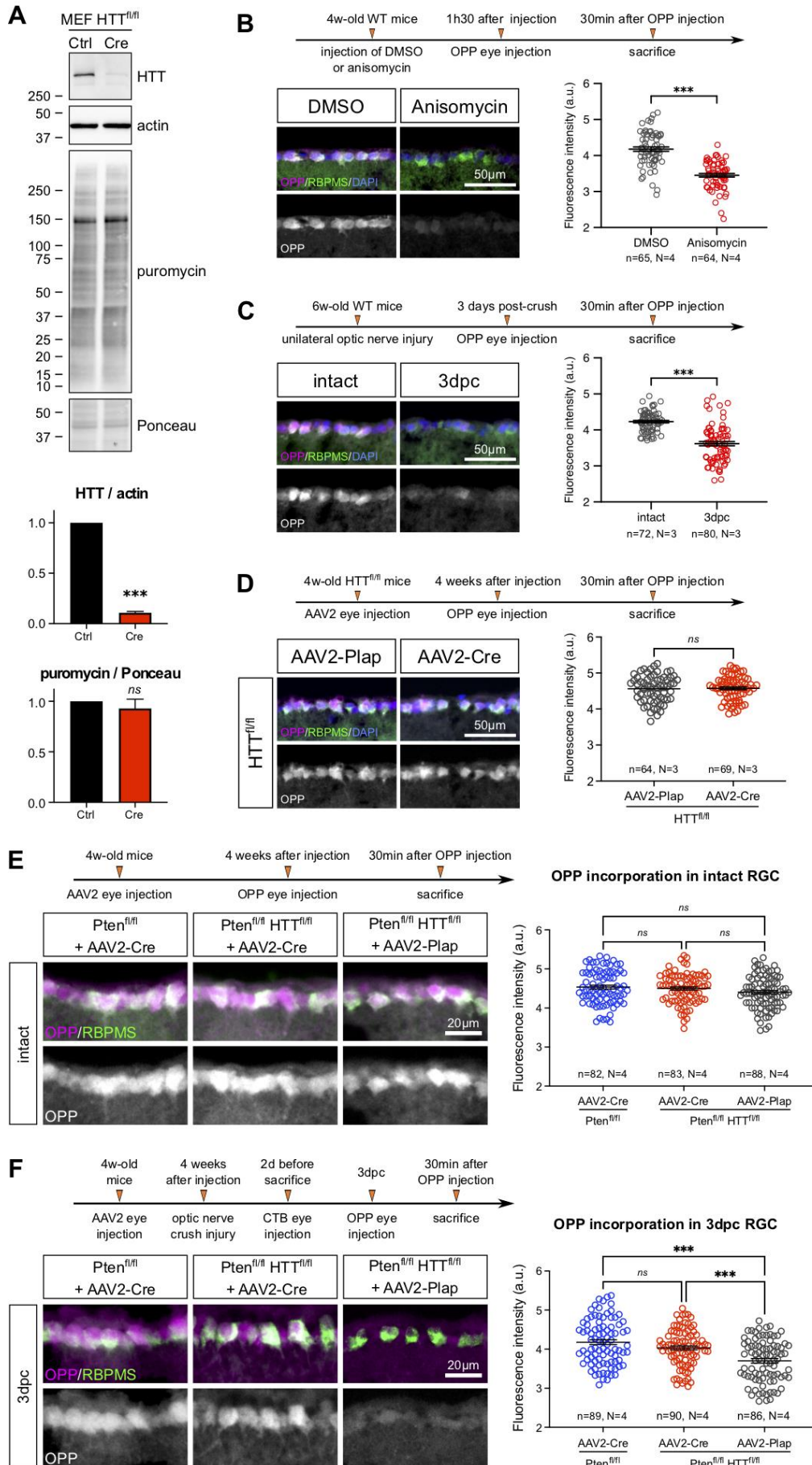


Figure 4: HTT deletion does not modify global translation.

(A) SUnSET assay showing puromycin incorporation revealed by immunoblotting in HTT-deleted (MEF $\text{HTT}^{\text{fl/fl}}$ +Cre) versus control. Unpaired t-test, ***p-value<0.001, ns: not significant.

(B) Representative images and quantification of OPP incorporation in WT RGC with DMSO or Anisomycin injection. Unpaired t-test, ***p-value<0.001.

(C) Representative images and quantification of OPP incorporation in intact and 3dpc RGC. Unpaired t-test, ***p-value<0.001.

(D) Representative images and quantification of OPP incorporation in $\text{HTT}^{\text{fl/fl}}$ +AAV2-Plap and $\text{HTT}^{\text{fl/fl}}$ +AAV2-Cre intact RGC. Unpaired t-test, ns: not significant.

(E) Representative images and quantification of OPP incorporation in $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}$ +AAV2-Cre, $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}$ $\text{HTT}^{\text{fl/fl}}$ +AAV2-Cre and $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}$ $\text{HTT}^{\text{fl/fl}}$ +AAV2-Plap intact RGC. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, ns: not significant.

(F) Representative images and quantification of OPP incorporation in $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}$ +AAV2-Cre, $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}$ $\text{HTT}^{\text{fl/fl}}$ +AAV2-Cre and $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}$ $\text{HTT}^{\text{fl/fl}}$ +AAV2-Plap RGC at 3dpc. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, ***p-value<0.001, ns: not significant.

Figure 5

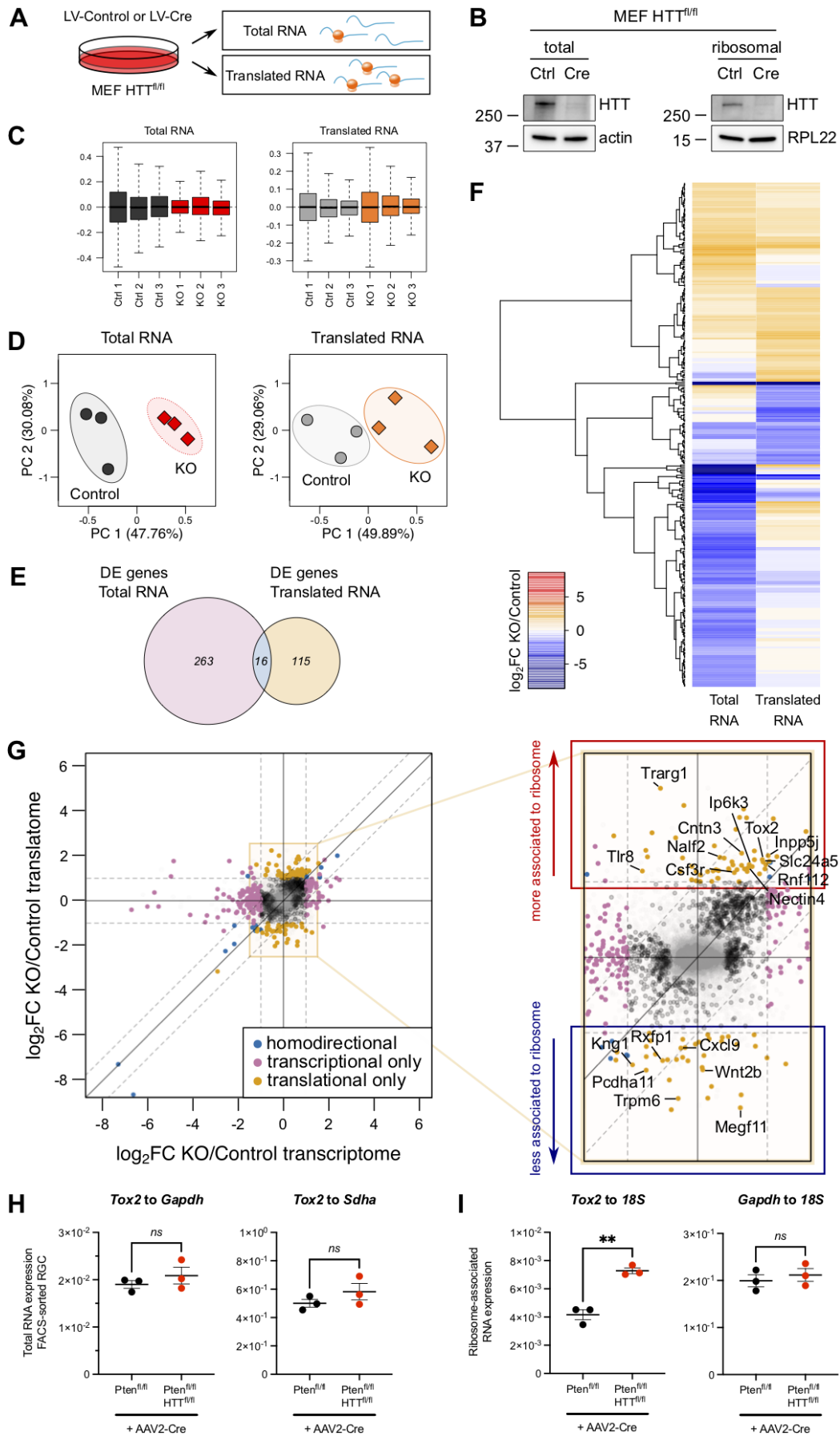


Figure 5: HTT regulates the association of a specific mRNA subset with ribosomes.

(A) Schematic representation of total and ribosome-associated RNA analysis by RNA-sequencing from MEF $\text{HTT}^{\text{fl/fl}}$ +LV-Cre versus control.

(B) Representative immunoblot of the total and purified ribosomal fractions of control and HTT-KO MEF lysate.

(C) Distribution of relative log expression (log-ratio of read count to median read count across samples) after normalization using residuals with RUVseq.

(D) Principal component analysis of individual replicates of total and ribosome-associated RNA samples. EdgeR with RUVseq normalization based on residuals.

(E) Venn diagram of differentially expressed genes identified in total and ribosome-associated RNA samples (FDR-corrected p-value<0.05, $|\log_2(\text{fold-change})|>1$).

(F) Heatmap of $\log_2(\text{fold-change})$ values between HTT-deleted (KO) and control conditions in total and ribosome-associated RNA samples, for genes differentially expressed in both datasets.

(G) Scatterplot of the $\log_2(\text{fold-change})$ in ribosome-associated RNA (translatome) versus the $\log_2(\text{fold-change})$ in total RNA (transcriptome). Blue hits: FDR-corrected p-value<0.05 and $|\log_2(\text{fold-change})|>1$ in both datasets. Pink hits: FDR-corrected p-value<0.05 and $|\log_2(\text{fold-change})|>1$ in transcriptome only. Orange hits: FDR-corrected p-value<0.05 and $|\log_2(\text{fold-change})|>1$ in translatome only.

(H) RT-qPCR analysis of *Tox2* mRNA level normalized to *Gapdh* and *Sdha* levels in $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}$ +AAV2-Cre and $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}$ $\text{HTT}^{\text{fl/fl}}$ +AAV2-Cre RGC at 3dpc. Unpaired t-test, ns: not significant.

(I) RT-qPCR analysis of *Tox2* and *Gapdh* mRNA levels normalized to *18S* level in immunoprecipitated ribosome fraction in $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}$ +AAV2-Cre and $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}$ $\text{HTT}^{\text{fl/fl}}$ +AAV2-Cre RGC at 3dpc. Unpaired t-test, **p-value<0.01, ns: not significant.

Figure 6

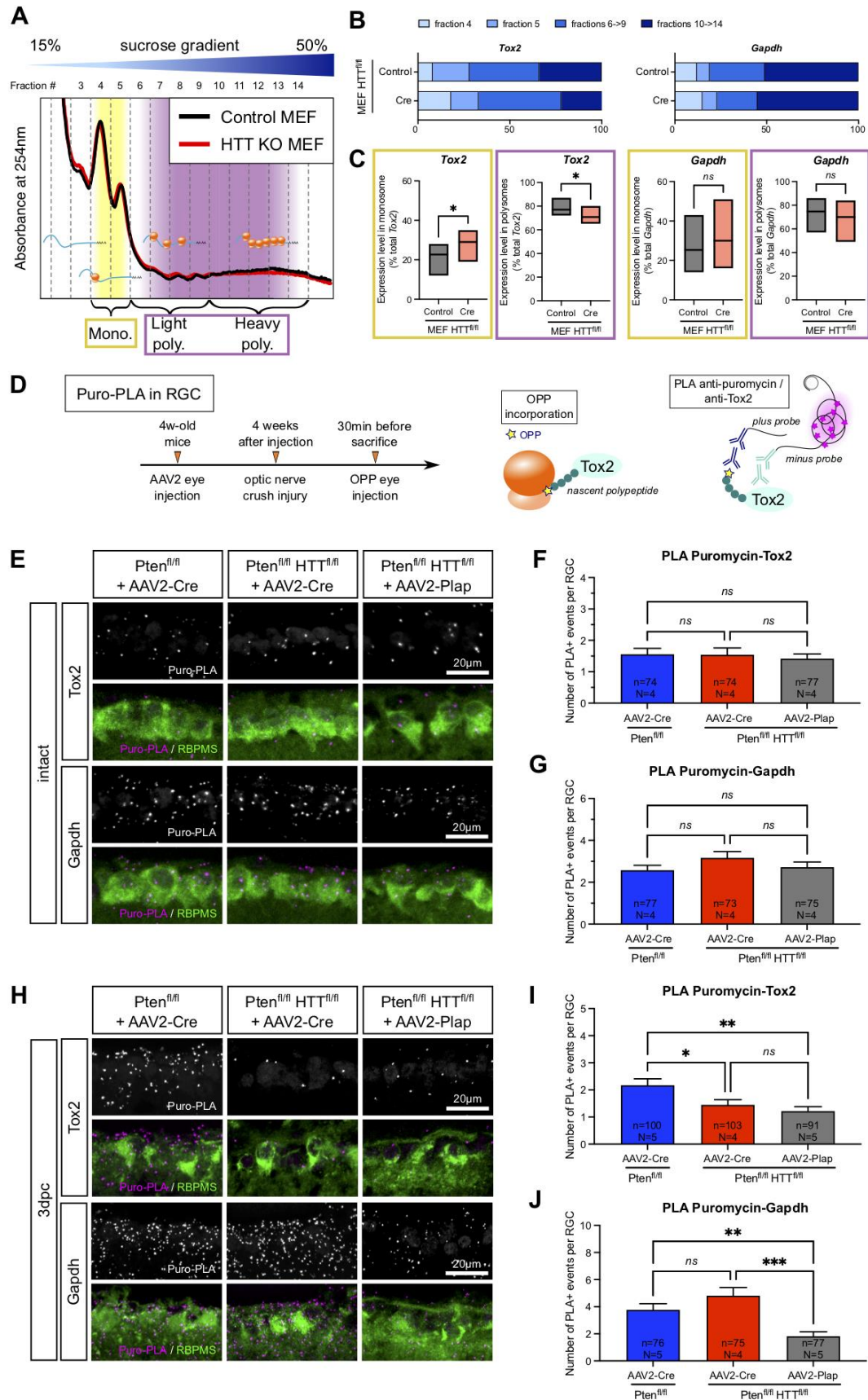


Figure 6: HTT controls axon regeneration via translational regulation of *Tox2* mRNA.

(A) Representative polysome profile of HTT-deleted (KO) MEF versus control on a 15-50% sucrose gradient.

(B) Representative *Tox2* and *Gapdh* mRNA distribution in fractions 4 to 14 of a polysome fractionation, in HTT-deleted (Cre) versus control MEF.

(C) *Tox2* and *Gapdh* mRNA distribution in monosomal (yellow) and polysomal (purple) fractions. Paired t-test, *p-value<0.05.

(D) Schematic principle of puromycin-PLA experiment in vivo.

(E) PLA staining confocal images for puromycin-Tox2 or puromycin-Gapdh, in intact RGC in Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre, Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre and Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap.

(F) Quantification of puromycin-Tox2 PLA-positive events in Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre, Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre and Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap intact RGC. Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons test, ns: not significant.

(G) Quantification of puromycin-Gapdh PLA-positive events in Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre, Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre and Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap intact RGC. Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons test, ns: not significant.

(H) PLA staining confocal images for puromycin-Tox2 or puromycin-Gapdh, in Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre, Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre and Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap RGC at 3dpc.

(I) Quantification of puromycin-Tox2 PLA-positive events in Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre, Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre and Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap RGC at 3dpc. Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons test, *p-value<0.05, **p-value<0.01, ns: not significant.

(J) Quantification of puromycin-Gapdh PLA-positive events in Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre, Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre and Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap RGC at 3dpc. Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons test, **p-value<0.01, ***p-value<0.001, ns: not significant.

Figure 7

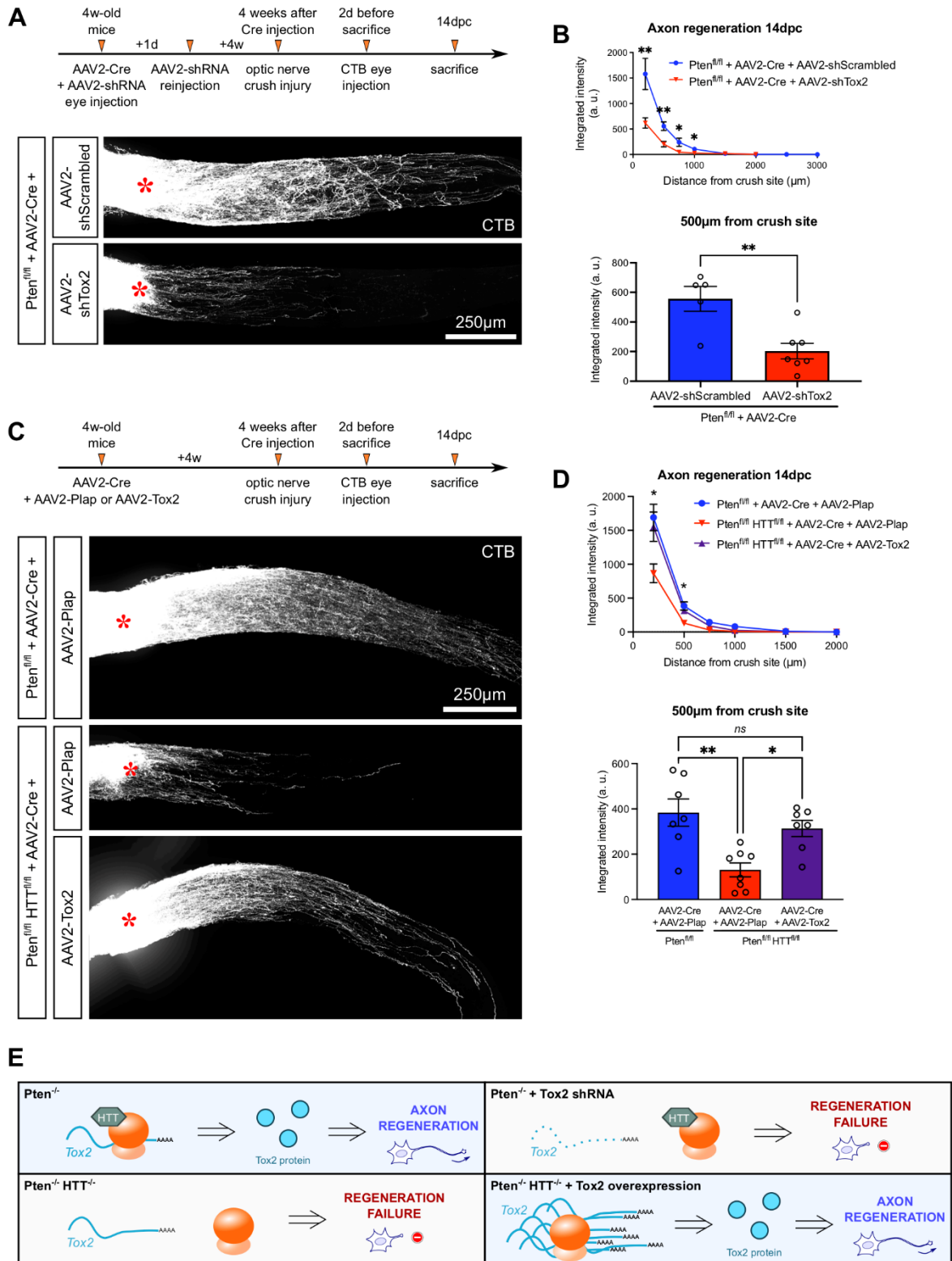


Figure 7: Regulation of Tox2 translation by HTT controls axon regeneration in vivo.

(A) Whole optic nerve confocal images showing CTB⁺ regenerating axons in Pten^{f1/f1}+AAV2-Cre+AAV2-shScrambled and Pten^{f1/f1}+AAV2-Cre+AAV2-shTox2 at 14dpc. The injury site is indicated by a red star.

(B) Quantification of integrated intensity of fluorescence along the optic nerve. Unpaired t-test, *p-value<0.05, **p-value<0.01, ns: not significant.

(C) Whole optic nerve confocal images showing CTB⁺ regenerating axons in Pten^{f1/f1} mice injected with AAV2-Cre+AAV2-Plap, Pten^{f1/f1}HTT^{f1/f1} with AAV2-Cre+AAV2-Plap, and Pten^{f1/f1}HTT^{f1/f1} with AAV2-Cre+AAV2-Tox2 at 14dpc. The injury site is indicated by a red star.

(D) Quantification of integrated intensity of fluorescence along the optic nerve. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, *p-value<0.05, **p-value<0.01, ns: not significant. The top graph gives the multiple comparisons test between Pten^{f1/f1}HTT^{f1/f1}+AAV2-Cre+AAV2-Plap and Pten^{f1/f1}HTT^{f1/f1}+AAV2-Cre+AAV2-Tox2 conditions.

(E) Proposed model showing HTT-dependent customization of ribosomes that controls specifically Tox2 translation and CNS axon regeneration.

Material and methods

Animals

All animal care and surgeries were performed in line with institutional, French and European guidelines. Experimental procedures are deposited under the project numbers APAFIS # 20191202144779_v4 and APAFIS # 38155-202205021448189 v5. For all experimental procedures, mice aged 3 or 4 weeks regardless of their sex were used unless otherwise stated. Mice were anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (Clorketam, 60-100mg/kg) and xylazine (Rompun, 5-10mg/kg). Mice of the following mutant lines were used: HTT-floxed¹⁹, Pten-floxed⁸³, Pten-floxed HTT-floxed, ROSA-tdTomato-floxed, HTT phosphorylation mutant lines (mimicking constitutive phosphorylation, S421D and S1181D/S1201D, or unphosphorylatable, S421A and S1181A/S1201A^{13,24}).

Intravitreal injection

Following anesthesia, the external edge of the eye was clamped using an artery clamp to display the conjunctiva. Using a glass micropipette connected to a 50µl Hamilton syringe (Hamilton, 80521), 1µl of vitreous humor was removed and 1µl of Adeno-associated type 2 virus (AAV2) was injected into the vitreous body of the eye. The following AAV2 viruses were used: AAV2-CMV-Cre-HA, AAV2-CMV-Placental alkaline phosphatase (Plap), AAV8-CMV-Cre-HA, AAV8-Plap, AAV2-SNCG-RPL22-flag, AAV2-U6-sh-Tox2-hSyn-mCherry, AAV2-U6-sh-scrambled-hSyn-mCherry, AAV2-CMV-Tox2-HA, AAV2-CMV-cRheb-HA, AAV2-CMV-BDNF-tdTomato. The shRNA targeting Tox2 (shTox2, 5'-GGGCGAGAGTAACGAAGACTA-3') was cloned under the control of a U6 promoter in a pAAV-U6-hSyn-mCherry plasmid. The scrambled sequence for the control shRNA (shScrambled) was 5'-GCTTACTAACCTCGGCAGT-3'. For overexpression, full-length mouse Tox2 fused to HA tag was cloned under the control of a CMV promoter in a pAAV-CMV. For anterograde labeling of regenerating axons, 1µl of 1µg/µl Alexa Fluor 555-conjugated cholera toxin beta subunit (CTB) ((ThermoFisher Scientific, C22843) was injected intravitreally 2-3 days before sacrifice. For in vivo O-propargyl-puromycin (OPP) incorporation assay, 1µl of 20µM Click-iT OPP (ThermoFisher Scientific, C10458) diluted in sterile PBS was injected intravitreally 30min before intracardial perfusion. Mice with eye inflammation or damage were excluded from the study.

Optic nerve crush

Optic nerve crush was performed 4 weeks after intravitreal injection of the viral vector or in 6-week-old wild-type mice, unless otherwise stated. Following anesthesia, the conjunctiva was opened with fine scissors (Fine Science Tools, 91500-09) and dilating forceps were carefully slid in-between the two arteries behind the eye ball to expose the underlying optic nerve. The optic nerve was pinched for 5 seconds using Dumont #5 forceps (Fine Science Tools, 11251-20) 1-2mm behind the eye ball. Mice with unstoppable heavy bleeding were excluded from the study. Mice were treated with paracetamol (Doliprane, 4mg/ml in drinking water) as painkiller for 48h following optic nerve crush.

Intrathecal injection

Intrathecal injection was performed on 3 to 4 week-old mice, as described⁸⁴. Following anesthesia, the dorsal skin was shaved and the vertebral column exposed by a small incision of the skin at the L4-L6 level. Using a 30G needle connected to a 50µl Hamilton syringe (Hamilton, 702LT), 10µl of Adeno-associated type 8 (AAV8) virus was injected into the spinal canal at L5 level. The following AAV8 viruses were used: AAV8-CMV-Cre, AAV8-CMV-Placental alkaline phosphatase (Plap). Muscles and skin were stitched with surgical staples. Mice were treated with paracetamol (Doliprane, 4mg/ml in drinking water) as painkiller for 48h following intrathecal injection.

Sciatic nerve injury

Sciatic nerve injury was performed 4 weeks following intrathecal injection. Following anesthesia, the left sciatic nerve was exposed thanks to an incision of the skin and muscles of the left thigh. The sciatic nerve was pinched for 15 seconds using Dumont #SS forceps (Fine Science Tools, 11203-25). The sciatic nerve received a second pinch of 5 seconds to ensure full axotomy. Mice were treated with paracetamol (Doliprane, 4mg/ml in drinking water) as painkiller for 48h following sciatic nerve injury.

Tissue dissection and processing

At the time of sacrifice, following anesthesia, mice were intracardially perfused with 50-100ml ice-cold PBS followed by 50-100ml 4% formaldehyde in PBS. Eyes and optic nerves were dissected out of the skull with fine scissors and forceps (FST) and post-fixed in 4% formaldehyde overnight at 4°C. For sciatic nerve injury experiments, L3 to L5 DRG and sciatic nerve were dissected and post-fixed in 4% formaldehyde overnight at 4°C.

Optic nerve clearing

For analysis of axon regeneration, optic nerves were cleared as previously described⁸⁵. Briefly, optic nerves were carefully separated from the eye body and dehydrated in baths of 50%, 80% and 95% ethanol in PBS (20min each) and 100% absolute ethanol (overnight). Optic nerves were incubated for 2hours in hexane then cleared in benzyl benzoate:benzyl alcohol (2:1). Whole optic nerves were mounted in benzyl benzoate:benzyl alcohol (2:1) under a coverslip and imaged with confocal microscopy (Andor spinning disk). The entire volume of the optic nerve was imaged with a z-step of 2µm. The entire optic nerve was imaged using a custom stitching module in Metamorph Microscope imaging software. The extent of axon regeneration was determined from the maximum projection of the z-stack. Integrated fluorescence was determined along the optic nerve at defined distances from the injury site, as described in²⁶.

Whole-mount retina immunohistochemistry

Retinas were dissected out of the eye ball using fine scissors and forceps (FST). Whole retinas were cut radially in a flower shape to facilitate mounting. After several washes in PBS, whole retinas were incubated in blocking solution (PBS 0.5% Triton X-100 5% donkey serum) for 1h at room temperature. Whole retinas were incubated in primary antibody diluted in blocking solution overnight at 4°C with gentle shaking. Primary antibodies used were: guinea pig anti-RBPMS (Millipore, ABN1376) 1:300; rabbit anti-pS6 (Cell Signaling Technology, 4857) 1:400. After several washes in PBS 0.1% Triton X-

100, whole retinas were incubated in secondary antibody diluted in blocking solution for 2h at room temperature. Secondary antibodies used were Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) diluted 1:500. After several washes in PBS 0.1% Triton X-100, whole retinas were flat-mounted in mounting medium (Fluoromount-G, ThermoFisher Scientific, 00-4959-52). Whole-mount retinas were imaged with epifluorescence microscopy (Nikon Ti2 Eclipse). Four representative pictures per retina were taken for the intact conditions, and eight representative pictures per retina were taken for the 14dpc conditions. For RGC survival experiments, RBPMS-positive and pS6-positive RGC were manually quantified in regions of interest of each representative picture using the cell counter module in Fiji. Numbers were averaged per individual retina.

Tissue cryosectioning

Eye balls were incubated in 15% sucrose in PBS for 48h at 4°C, then embedded in tissue freezing medium (MM-France, F/TFM-C). DRG and sciatic nerves were incubated in 30% sucrose in PBS for 48h at 4°C, then embedded in tissue freezing medium (MM-France, F/TFM-C). Blocks were frozen at -80°C. 12µm longitudinal sections for sciatic nerves and 14µm sagittal sections for eyes were obtained with a cryostat device (Thermo Scientific CryoStar NX50 Cryostat) and mounted on SuperFrost Plus adhesion slides (Thermo Scientific, J1800AMNZ). All sections on slides were kept frozen at -20°C until use.

Immunohistochemistry

Sections on slides were left to defrost at room temperature before immunostaining. After several washes in PBS, sections were incubated in blocking solution (PBS 0.1% Triton X-100 5% donkey serum) for 1h at room temperature. For DRG and sciatic nerve tissues, sections were incubated in blocking solution (PBS 0.5% Triton X-100 5% bovine serum albumin (BSA)) for 1h at room temperature. Sections were incubated in primary antibody diluted in blocking solution overnight at 4°C. Primary antibodies used were: mouse anti-HTT (Sigma-Aldrich, MAB2166) 1:100; guinea pig anti-RBPMS (Millipore, ABN1376) 1:300; rabbit anti-pS6 (Cell Signaling Technology, 4857) 1:400; rabbit anti-Tox2 (Sigma-Aldrich, HPA058396) 1:100; mouse anti-puromycin (Sigma-Aldrich, MABE343) 1:250; mouse anti-Tubulin β III (Biolegend, 801213) 1:500; rabbit anti-SCG10 (Novus Biologicals, NBP1-49461) 1:1000. After several washes in PBS, sections were incubated in secondary antibody diluted in blocking solution for 2h at room temperature. Secondary antibodies used were Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) 1:500. After several washes in PBS, sections were mounted in mounting medium with DAPI (Fluoromount-G, ThermoFisher Scientific, 00-4959-52). Retina sections and sciatic nerve sections were imaged with epifluorescence microscopy (Nikon Ti2 Eclipse) or with confocal microscopy (spinning disk Dragonfly from Andor). For eye sections, images were randomly taken along individual retina sections, so as to represent all eyes and all sections on the slide of interest. For fluorescence intensity experiments, the mean intensity was determined using Fiji in manually defined regions of interest corresponding to individual RGC on representative images. For sciatic nerve sections, all sections of an individual nerve were imaged and used for quantification, unless the section was altered. For fluorescence intensity quantification, the mean intensity was determined using Fiji in 100µm-wide regions of interest at defined steps from the injury site. For calculation of the regeneration index (RI50), an exponential regression was performed on the intensity data normalized to that of the crush site (distance 0). The RI50 index was calculated as the value of the distance at 50% of intensity.

OPP labeling

OPP was labeled on sections with Click-iT chemistry (Click-iT Plus OPP Alexa Fluor 647 Protein Synthesis Assay Kit, ThermoFisher Scientific, C10458). After several washes in PBS, sections were permeabilized in PBS 0.1% Triton X-100 for 15min at room temperature. Sections were incubated for 30min at room temperature in the reaction mix (containing Alexa Fluor dye picolyl azide, prepared according to manufacturer's instructions), then incubated in rinsing buffer for 5min. After several washes in PBS, sections were immunostained, imaged and quantified as described above.

In situ hybridization

In situ hybridization was performed as previously described⁸⁶. Templates of antisense in situ hybridization probes for HTT and Tox2 were cloned in a pGEMT easy vector (Promega) and synthesized using digoxigenin (DIG) RNA labelling Kit (Roche) after linearization of the plasmid. The sequence for HTT probe corresponds to nucleotides 346-1614 of mouse HTT mRNA (accession number NM_010414). The sequence for Tox2 probe corresponds to nucleotides 94-853 of mouse Tox2 mRNA (accession number NM_001098799.2). After hybridization of the DIG-labelled probe on slides, the alkaline phosphatase-conjugated anti-digoxigenin antibody (Roche, 11093274910) was incubated overnight at room temperature. Alkaline phosphatase staining was probed with NBT-BCIP (Roche, 11681451001). Slides were washed and post-fixed after reaching the appropriate coloration intensity. For fluorescent in situ hybridization, signal detection of alkaline phosphatase was performed using Fast Red and naphthol (Sigma-Aldrich, F4648).

Proximity ligation assay

This assay is used to detect the proximity between target antigens with oligonucleotide-coupled secondary antibodies and signal amplification. To perform the proximity ligation assay, the Duolink PLA kit (Sigma-Aldrich, DUO92013) was used according to the manufacturer's instructions. Sections on slides were first left to defrost at room temperature. After several washes in PBS, sections were permeabilized in PBS 0.5% Triton for 15min. Sections were blocked in Duolink blocking buffer (Duolink, Sigma-Aldrich, DUO82007) for 1h at 37°C. Sections were incubated overnight at 4°C with mouse anti-HTT (clone 4c8, Sigma-Aldrich, MAB2166) 1:100 and rabbit anti-RPS6 (Cell Signaling Technology, 2217) 1:250; or with rabbit anti-HTT (clone d7F7, Cell Signaling Technology, 5656) 1:100 and mouse anti-rRNA (clone Y10b, Santa Cruz Biotechnology, sc-33678) 1:100. After two 5min washes with wash buffer A (Duolink, Sigma-Aldrich, DUO82046), sections were incubated for 1h at 37°C with complementary minus probe-conjugated anti-mouse antibody and plus probe-conjugated anti-rabbit antibody (Duolink, Sigma-Aldrich, DUO92004 and DUO92002). After two 5min buffer A washes, sections were processed for ligation with ligase diluted 1:40 in ligation buffer for 30min at 37°C. After two 5min buffer A washes, sections were processed for amplification with polymerase diluted 1:80 in amplification buffer for 100min at 37°C. Sections were washed twice 10min with 1x wash buffer B, then 1min with 0.01x wash buffer B. Sections were post-fixed in 4% formaldehyde for 15min at room temperature, then processed for immunohistochemistry.

Adult retina explant cultures and live imaging

For live imaging of BDNF-carrying vesicles, ex vivo cultures of adult retina explants were used as described²⁶. 4 week-old WT or HTT phospho-mutant mice (S421 mutation site, HTT S421^{A/A} or HTT S421^{D/D}) were injected intravitreally with AAV2-cRheb, then with AAV2-BDNF-tdTomato one day after. Two weeks after injection, mice were sacrificed by cervical dislocation and retinas were dissected in ice-cold HBSS. Explants of 0.5mm in diameter were prepared and plated on glass-bottom dishes (MatTek, P35G-1.0-20-C) previously coated with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, P1399), laminin (Sigma-Aldrich, L2020) and coating medium (4µg/ml methylcellulose (Sigma-Aldrich, M0512) in Hibernate A (BrainBits, HA)). Explants were cultured in Neurobasal-A (Thermo Fisher Scientific, 10888022) supplemented with 1X B-27 (Thermo Fisher Scientific, 12587-010), 1% L-Glutamine (Thermo Fisher Scientific, 25-005-CI) and 1% penicillin-streptomycin (ThermoFisher Scientific, 15140122) for two weeks before imaging. Imaging was performed with confocal microscopy (Andor spinning disk). BDNF vesicles were imaged in individual axons, at a rate of 1 image per second for 2min.

Kymograph analysis

Kymograph analysis was performed using the KymoToolBox plugin in Fiji⁸⁷. Regions of interest were designed as segmented lines of 60-200µm along the axon, oriented towards the tip of the axon. Vesicle trajectories were manually drawn from the kymograph and analyzed with the Analyse Kymo tool. For each vesicle, the following parameters were calculated: Anterograde velocity = V_{Ma} (µm/s) = Anterograde distance (µm) / Time (s), Retrograde velocity = V_{Mr} (µm/s) = Retrograde distance (µm) / Time (s), Net directionality = Q (µm/s) = $V_{Mr} \times$ Relative number of retrograde vesicles + $V_{Ma} \times$ Relative number of anterograde vesicles.

STRING interactome analysis

The list of 747 binding partners of HTT in the mouse brain was retrieved from²⁸. The list was subjected to Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) network analysis and representation²⁹. Each node represents one protein. Network edges represent confidence with minimum interaction score of 0.9 (highest confidence). Disconnected nodes in the network are hidden from the representation. Network was clustered following a Markov cluster algorithm with inflation parameter of 3.

Culture of mouse embryonic fibroblasts (MEF)

Primary cultures of MEF were prepared from E13.5 embryos according to⁸⁸. E13.5 embryos were collected in PBS. Heart, liver and brain were dissected away and the remaining embryonic tissues were transferred to a culture dish containing 0.25% Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific). Tissue was cut in small pieces using a razor blade, then passed through a 10ml pipette several times to ensure dissociation. Tissue was incubated for 15min at 37°C and passed once more through a 5ml pipette.

Cell culture

MEF were maintained at 37°C 5% CO₂ in 10cm dishes in cell culture medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 31966047), high glucose, GlutaMAX Supplement, Thermo Fisher Scientific,

10% decompemented fetal bovine serum (FBS, Eurobio Scientific, CVFVSF00-01, 56°C for 30min), 1% penicillin-streptomycin (ThermoFisher Scientific, 15140122), 1% L-Glutamine (Thermo Fisher Scientific, 25-005-CI). When reaching confluency, cells were detached by washing 1x in PBS then by incubating in 2ml Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific, 25-050-CI) at 37°C for 5-10min. Cells were collected by adding fresh cell culture medium and pelleted by centrifugating at 180rcf for 5min. Cells were resuspended in 1ml cell culture medium and replated 1:3 or 1:4 in fresh medium.

BCA protein assay

Protein concentration was quantified using a BCA protein assay (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, 23225) according to the manufacturer's instructions. The standard curve was obtained by diluting bovine serum albumin (BSA) to concentrations ranging from 2mg/ml to 25µg/ml. 5µl of diluted sample or diluted BSA was mixed with 200µl of BCA working reagent (ratio Reagent A to Reagent B = 50:1) in a 96-well plate. Each sample or point of standard curve was quantified in duplicate. The reaction was incubated at 37°C for 30min. 562nm absorbance was measured with a plate reader (PHERAstar FS) and protein concentration was inferred from the standard curve.

Preparation of cell lysate

All steps were performed on ice or at 4°C unless otherwise stated. MEF were washed 1x in PBS then scraped in PBS and pelleted at 1,200rcf for 5min. Cells were lysed in 1ml RIPA buffer (10mM Tris-HCl pH7.5, TritonX-100 1%, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 2.5mM sodium deoxycholate) supplemented with protease inhibitors (cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche, 04693159001). Proteins were extracted by 15min incubation on ice, followed by 15min centrifugation at 14,000rcf at 4°C. The supernatant was transferred to a new tube. Protein concentration was quantified with a BCA protein assay (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, 23225). Samples were mixed with Laemmli 6x and heated for 4min at 95°C.

Western blot

Polyacrylamide gels were precast (4-15%, Bio-Rad, #4568083) or handcast (6%, 10% or 12%). For handcast gels, the separating gel was obtained by polymerisation of acrylamide (Sigma, A3699) mixed with ammonium persulfate (APS) (Euromedex, EU0009-A) and TEMED (Euromedex, 50406-A) in SDS-containing buffer (375mM Tris-HCl, pH8.8, 0.1% SDS). The separating gel was overlaid with a 5% stacking gel. Handcast gels were casted in Bio-Rad polyacrylamide gel casting system. For Western blot analysis, 5-20µg protein were loaded in individual wells. Electrophoresis was run in SDS-containing running buffer (Tris-Glycine SDS, Euromedex, EU0510) for 10min at 90V, constant voltage, then for 45min-1h at 150V-220V, constant voltage, depending on polyacrylamide percentage. In at least one well, 10µl Precision Plus Protein Kaleidoscope Prestained Protein Standards (Bio-Rad, 1610375) were loaded as a molecular weight marker. Proteins separated by electrophoresis were transferred onto nitrocellulose membrane (ThermoFisher Scientific, 88018) in transfer buffer (Tris-Glycine, Euromedex, EU0550) containing 20% ethanol. Transfer was performed for 2hours 30min at 320mA, constant amperage. Membranes were stained with Ponceau to ensure correct transfer and even loading of proteins, then blocked for 1hour in Tris-buffered saline (TBS, Euromedex, ET220-B) 0.05% Tween-20 (Sigma, P9416) (TBS-T) 5% semi-skimmed powder milk. Membranes were incubated in primary antibody diluted in TBS-T 5% milk overnight at 4°C with gentle agitation. Primary antibodies used

were: mouse anti-HTT (Sigma-Aldrich, MAB2166) 1:500; mouse anti-puromycin (Millipore, MABE343) 1:1000; mouse anti-actin (Sigma-Aldrich, A1978) 1:5000; mouse anti-RPL22 (Santa Cruz Biotechnology, sc-373993) 1:1000; rabbit anti-RPL3 (Abcam, ab228638) 1:1000, mouse anti-Hsp60 (Santa Cruz Biotechnology, sc-376240) 1:1000; rabbit anti-Pabp1 (Cell Signaling Technology, 4992) 1:1000; rabbit anti-eIF4G (Cell Signaling Technology, 2498) 1:1000; rabbit anti-RPS6 (Cell Signaling Technology, 2217) 1:1000; rabbit anti-Gapdh (Cell Signaling Technology, 2118) 1:1000; rabbit anti-Histone 3 (His3) (Cell Signaling Technology, 9715) 1:1000. Membranes were washed 4 times 5min in TBS-T, then incubated in secondary antibody diluted in TBS-T 5% milk for 2hours at room temperature. Secondary antibodies used were: horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse (ThermoFisher Scientific, A16011), HRP-conjugated anti-rabbit (Proteintech, SA00001-2). Membranes were washed four times 5min in TBS-T, then probed for enhanced chemiluminescence (ECL) in 100mM Tris-HCl, pH8.5, 0.5% luminol, 0.5% coumaric acid and 0.01% H₂O₂. Protein detection was performed using ChemiDoc (ChemiDoc MP Imaging System).

Immunoprecipitation

All steps were performed at 4°C or on ice. WT MEF from 4 confluent 10cm dishes were washed once in PBS then harvested by scraping in PBS and pelleted at 1,200rcf for 5min. Cells were lysed in 1ml lysis buffer (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 50mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Triton) supplemented with protease inhibitors (cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche, 04693159001). Proteins were extracted by 20min incubation at 4°C with end-over-end agitation, followed by 20min centrifugation at 14,000rcf. The supernatant was transferred to a new tube and 50µl cell lysate was spared for analysis. 950µl cell lysate was pre-cleared for 1h with 95µl protein G magnetic beads (SureBeads, Bio-Rad, 1614023) pre-washed 3x in lysis buffer, with end-over-end agitation. Beads were separated on a magnetic rack and discarded. 50µl pre-cleared cell lysate was spared for analysis of input fraction. Half volume (450µl) of pre-cleared lysate was incubated with 5µl of mouse anti-HTT antibody (clone 4c8, Sigma-Aldrich, MAB2166) and the other half (450µl) with 5µl of mouse IgG (ThermoFisher Scientific, 31903) for 2h with end-over-end agitation. 45µl pre-washed protein G magnetic beads were added to each tube and incubated for 1h with end-over-end agitation. Beads were separated on a magnetic rack and washed 3x in lysis buffer. Beads were resuspended in 45µl Laemmli 1x, then vortexed for a few seconds and heated for 4min at 95°C. The immunoprecipitate was collected after separating beads on a magnetic rack and analysed by silver staining or Western blot.

Silver staining

Silver staining was performed according to the manufacturer's instructions (SilverQuest Silver Staining Kit, ThermoFisher Scientific, 45-1001). Briefly, after electrophoresis, the gel was fixed in fixative solution (40% ethanol, 10% acetic acid) for 20 min. After 30% ethanol wash, the gel was incubated for 10 min in the sensitizing solution. After washes, the gel was incubated for 15min in the staining solution, followed by 4 to 8min incubation in the developing solution. When reaching the appropriate staining intensity, the reaction was stopped and the gel was imaged using ChemiDoc.

Cell transduction

MEF were transduced with a lentiviral vector encoding the Cre recombinase (LV-Cre-GFP, Addgene #86805) or a control lentiviral vector (H2B-eGFP, Addgene #25999). After 1 day in culture, medium

was replaced. Cells were kept for 7 days after transduction before harvesting. Deletion of HTT was monitored using Western blot analysis.

Ribosome purification

Ribosome purification was performed as previously described³⁰. All steps were performed at 4°C or on ice, unless otherwise specified. WT MEF from 1 to 2 confluent 15cm dishes were washed in 1x PBS then scraped in PBS and pelleted at 500rcf for 5min. Cells were resuspended in 1ml buffer A (250mM sucrose, 250mM KCl, 5mM MgCl₂, 50mM Tris-HCl, pH 7.4). 50µl cell suspension was spared and mixed 1:1 with Laemmli 2x (4% SDS, 60mM TrisHCl pH 6.8, 200mM DL-Dithiothreitol) to obtain the total fraction. NP-40 was added to the cell suspension to obtain a final concentration of 0.7% (v/v). Cells were lysed by 15min incubation on ice with pipetting every 5min. Cell lysate was centrifuged at 750rcf for 10min. The pellet (nuclear fraction) was resuspended in Laemmli 1x to obtain the nuclear fraction. The supernatant (cytoplasmic fraction) was centrifuged at 12,500rcf for 10min. The pellet (mitochondrial fraction) was resuspended in Laemmli 1x to obtain the mitochondrial fraction. 50µl of the supernatant was spared and mixed 1:1 with Laemmli 2x to obtain the post-mitochondrial fraction. The rest of the supernatant was carefully layered on a 1ml sucrose cushion (1M sucrose, 500mM KCl, 5mM MgCl₂, 50mM Tris-HCl, pH 7.4) in a 3.5ml polycarbonate tube (Beckman Coulter). Tubes were balanced with buffer B (250mM sucrose, 500mM KCl, 5mM MgCl₂, 50mM Tris-HCl, pH 7.4), then ultracentrifuged at 250,000rcf for 2h. 50µl of the top layer of the supernatant was collected and mixed with Laemmli 2x to obtain the post-ribosomal fraction. The pellet (ribosomal fraction) was resuspended in Laemmli 1x to obtain the ribosomal fraction. All fractions were quantified with a BCA protein assay (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, 23225). For Western blot analysis, 10-20µg proteins of each fraction were loaded, except the post-ribosomal fraction for which 30µl were loaded. The markers used for characterization of the different fractions are: Histone 3 (His3, nuclear), Hsp60 (mitochondrial), Gapdh (cytoplasmic), RPL22 or RPS6 (ribosomal).

Puromycin incorporation assay (SUnSET assay)

MEF were incubated with 25µg/ml puromycin (Sigma-Aldrich, P8833) for 15min at 37°C. MEF were washed once with fresh medium, then washed and scraped in ice-cold PBS for subsequent protein extraction and Western blot analysis.

Polysome gradient

MEF were incubated with 25µg/ml Emetine (Sigma-Aldrich, E2375) for 20min at 37°C. Cells were washed with PBS then incubated with 0.25% Trypsin-EDTA and collected by centrifugation. The cell pellet was washed twice with ice-cold PBS and centrifuged at 500rcf for 5min at 4°C. Cells were resuspended in 3x cell pellet volumes of buffer A³⁰ (250mM sucrose, 250mM KCl, 5mM MgCl₂, 50mM Tris-HCl, pH7.4) containing protease inhibitors (cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche). For cell lysis, NP-40 was added to a final concentration of 1% and the cell suspension was homogenized on ice for 10min, with multiple pipetting. The cell lysate was centrifuged at 750rcf for 10min at 4°C to isolate the nuclei, then the supernatant was centrifuged at 12,500rcf for 10min at 4°C to isolate the mitochondria. The supernatant was transferred to a new tube and protein concentration was quantified using a BCA protein assay. Protein samples (1-3mg) were loaded on a 15-50% sucrose gradient in 2.5mM KCl, 0.5mM MgCl₂, 5mM Tris-HCl, pH 7.4. Gradients were prepared in 13.2ml

ultracentrifuge tubes (Beckman Coulter, 344059) using a Gradient Master (BioComp Instruments). After balancing the tubes, gradients were ultracentrifuged in SW41-Ti swinging buckets at 250,000rcf for 1h45 at 4°C with slow brake speed. 254nm absorbance was read with a fractionator (Piston Gradient Fractionator PGFip, BioComp Instruments) and 700µl successive fractions were collected using the FoxR1 fraction collector (Teledyne ISCO). For RNA extraction, fractions were immediately frozen on dry ice and kept at -80°C until further processing. For protein extraction, 175µl trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich, T0699) was added to each fraction and proteins were left to precipitate overnight at -20°C.

Cell treatment

For analysis of HTT distribution in polysomes, MEF were first incubated with 25µg/ml puromycin (Sigma-Aldrich, P8833) for 30min at 37°C, or with 2µg/ml harringtonin (Santa Cruz Biotechnology, sc-204771) for 5min at 37°C. For RNase I treatment, MEF lysate was obtained from WT MEF and incubated with 1µl RNase I (100U/µl) (Invitrogen, AM2294) for 10min on ice, then with 2µl SupersaseIn RNase inhibitor (20U/µl) (Invitrogen, AM2694) for 10min on ice. For EDTA treatment, MEF lysate was obtained from WT MEF and incubated with 30mM EDTA for 20min on ice.

Protein extraction from polysomal fractions

Fractions were centrifuged at 20,000rcf for 20min at 4°C. Each supernatant was carefully removed and discarded, and each pellet was washed with 500µl ice-cold acetone then centrifuged again at 20,000rcf for 5min at 4°C. The acetone washing step was repeated twice. After the third wash, the residual acetone was removed by heating the samples at 95°C for 5min. Each pellet was resuspended in 50µl Laemmli 2x, then vortexed for a few seconds and heated for 5min at 95°C. For Western blot analysis, the same volume of each fraction was loaded on a polyacrylamide gel.

RNA extraction and RT-qPCR from polysomal fractions

Polysomal fractions were defrosted on ice and half of each fraction was used for RNA extraction. 100pg of Firefly luciferase RNA was added in each fraction for spike-in normalization. Fractions of interest were pooled according to their distribution (fractions 4 and 5 corresponding to monosomes, fractions 6 to 9 corresponding to light polysomes and fractions 10 to 14 corresponding to heavy polysomes). RNA was precipitated overnight at -20°C using 11.25µg GlycoBlue coprecipitant (ThermoFisher Scientific, AM9515), 30µl of 7.5M LiCl (ThermoFisher Scientific, 10498254) and 1ml of 100% ethanol per 350µl fraction volume. RNA was pelleted by centrifugation at 16,000rcf for 30min at 4°C. The supernatant was decanted and the pellet was resuspended in 350µl buffer RLT (RNeasy Micro kit, Qiagen, 74004) containing β-mercaptoethanol according to manufacturer's instructions. RNA was subsequently purified with the RNeasy Micro kit for RNA isolation (Qiagen), with an in-column step of DNase I treatment. RNA was finally eluted in 14µl H₂O per column and RNA concentration was determined using Bioanalyzer analysis on a PicoChip (Agilent, 5067-1513). Reverse transcription was performed using SuperScript II kit (Invitrogen, 18064022) with at least 2ng starting amount of RNA per fraction in a final reaction volume of 40µl. qPCR was performed using SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 1725271). The following primers were used: Tox2 forward 5'-ATGGTGACAGTGCCTACGTG-3', Tox2 reverse 5'-AGGGATGGCTCAGGGAGATT-3', Gapdh forward 5'-GCATGGCCTTCCGTGTTTC-3', Gapdh reverse 5'-

TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT-3',	Firefly	luciferase	forward	5'-
CATGGAAGACGCCAAAAACAT-3',	Firefly	luciferase	reverse	5'-
AATTCTTACACGGCGATCTTT-3'.				

MEF ribosome-associated RNA extraction

For transcriptome and translome analysis, HTT^{fl/fl} MEF were transduced with Cre-expressing lentivirus or control lentivirus for 7 days. Cells were processed for ribosome purification. A fraction (1/15) of the cell suspension was kept for total RNA analysis (transcriptome), pelleted and resuspended in 1ml TRIzol Reagent (Invitrogen, 15596-026). After ribosome purification, the ribosome pellet was washed twice with ice-cold H₂O, resuspended in 1ml TRIzol Reagent and homogenized very well by vortexing. Total RNA and ribosome-associated RNA was extracted with Trizol/chloroform extraction and isopropanol precipitation as per the manufacturer's instructions. After washing once with 75% ethanol and drying, the RNA pellet was resuspended in 50µl H₂O. 8µl RNA was treated with DNase I (Sigma-Aldrich, AMPD1) as per the manufacturer's instructions. The final RNA concentration was determined using the Nanodrop (ThermoFisher Scientific, Nanodrop One).

Library preparation

Libraries were prepared from n=3 independent replicates for total RNA and n=3 independent replicates for translated RNA. Quality control was performed by Genewiz using RNA Screentape on Agilent TapeStation. All samples had a RNA quality number (RQN) > 9. Library preparation and RNA-sequencing were performed by Genewiz. Libraries (stranded, reverse) were prepared with NEBNext Ultra II Directional RNA Library preparation kit with 250ng RNA as starting amount. RNA-sequencing analysis was performed on an Illumina NovaSeq 6000 platform, with paired-end reading (2x150bp). Adapters were trimmed by Genewiz before data processing. FastQC control was performed by Genewiz. Mean quality score was > 35 for all samples. The percentage of bases with a quality score ≥ 30 was > 92% for all samples. Read depth was > 19M reads for all samples.

RNA-seq data analysis

Fastq files were processed for alignment and read count. The mouse genome (Mus_musculus.GRCm38.dna.toplevel.fa) was indexed using STAR (version 2.7.2b), using 149bp overhangs and gene annotation (Mus_musculus.GRCm38.97.chr.gtf). Reads were aligned to the genome using STAR. The percentage of uniquely mapped reads was > 88% for all samples. Reads were counted with HTSeq-count (version 0.11.1). Differential gene expression analysis was performed separately for the transcriptome and for the translome using edgeR⁸⁹. Read counts were first normalized using RUVSeq⁹⁰ with the RUVr method based on the residuals from the GLM fit after upper quartile normalization (number of residuals k=2). RNA-sequencing data are deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database under accession code GSE209946.

Retina dissociation for cell sorting

Pten^{fl/fl} or Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl} were previously injected bilaterally with AAV2-Cre. Four weeks later, both optic nerves were crushed. 3 days after injury (3dpc) mice were sacrificed by cervical dislocation. All

steps were performed on ice, unless otherwise stated. Eyes were enucleated and retinas were dissected in ice-cold HBSS and transferred to a new tube containing 1ml HBSS (3-5 retinas per tube). The tissue was incubated in 500µl of dissociation buffer (HBSS containing 1mg/ml papain (Sigma-Aldrich), 1mM L-cystein, 0.5mM EDTA, DNase I 1:500) at 37°C for 10min. Digestion was deactivated using 750µl trypsin inhibitor solution (1mg/ml in HBSS containing DNase I 1:500). The tissue was collected by 150rcf centrifugation for 1min30s. The tissue was resuspended in 200µl of RGC solution (L-glutamin 1x in Hibernate A, A12475-01) and cells were mechanically dissociated on ice with gentle pipetting through a 200µl pipette tip. Staining was performed by adding 200µl staining solution (PE-Cyanine 5 anti-mouse CD90.2 (Thy1.2, eBioscience) to a final concentration of 1:400, and DAPI to a final concentration of 10µg/ml). Cells were stained 20min on ice in the dark. Cells were washed twice with centrifugation at 150rcf for 5min and resuspension in 500µl RGC solution. Final volume was adjusted to 1ml with RGC solution and samples were processed for cell sorting.

RGC cell sorting and RNA extraction

Fluorescence-activated cell sorting (FACS) was performed on the FACS and microscopy facility of Institute of Advanced Biology (IAB), Grenoble, France. Cells are isolated by flow cytometry on a Aria II (BD Biosciences) cell sorter through a 100µm nozzle at 20psi. Dissociated retinal cells are gated based on scattering characteristics (FSC/SSC), doublet exclusion with width and height parameters and live/dead discrimination. DAPI and PE-Cy5 fluorescence were excited respectively with 405nm and 561nm lasers and collected through 405/50nm and 670/30nm band pass filters. WT unstained retinal cells are used as a control for autofluorescence assessment. PE-Cy5-Thy1-positive DAPI-negative population was retained for the sorting. 100,000 PE-Cy5-positive DAPI-negative cells were collected per individual replicate. Cells were collected in a tube containing 400µl of lysis buffer of PicoPure RNA extraction kit (KIT0204). The lysate was incubated 30min at 42°C, then processed for RNA extraction according to the manufacturer's instructions, with a DNase I in-column digestion step. Finally, RNA was eluted in 25µl water.

Ribosome immunoprecipitation and RNA extraction

3-week-old *Pten^{fl/fl}* or *Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}* were injected bilaterally with AAV2-RPL22-flag. 1 week later, mice were injected bilaterally with AAV2-Cre. Four weeks later, optic nerve crush was performed bilaterally. 3 days after injury, mice were sacrificed by cervical dislocation. All subsequent steps were performed on ice or at 4°C, unless otherwise stated. Eyes were enucleated and retinas were dissected in ice-cold PBS and transferred to a new tube containing 200µl lysis buffer (10mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.5mM EDTA, 1% Triton X-100) supplemented with protease inhibitors (cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche, 04693159001). For each biological replicate, 4-5 retinas were pooled. The tissue was mechanically lysed using stainless steel grinding beads and a tissue homogenizer (Retsch, Mixer Mill MM400, 30 pulsations per second for 30sec). The lysate was transferred to a new tube and centrifuged at 750rcf for 10min. The supernatant was transferred to a new tube and centrifuged at 12,500rcf for 10min. The supernatant was transferred to a new tube and protein concentration was determined using a BCA protein assay (Pierce, 23225). 1mg protein was prepared in 400µl lysis buffer and 600µl wash buffer (10mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.5mM EDTA). Protein lysates were pre-cleared with 100µl protein G beads (Bio-Rad, 1614023) (previously washed with wash buffer) for 2hours at 4°C with end-over-end agitation. Beads were separated on a magnetic rack and discarded. Half volume (500µl) of pre-cleared lysate was incubated with 5µl of mouse anti-

flag antibody (1mg/ml, Sigma-Aldrich, F1804) and the other half (500µl) with 5µl of 1mg/ml mouse IgG (ThermoFisher Scientific, 31903) overnight with end-over-end agitation. 45µl pre-washed protein G magnetic beads were added to each tube and incubated for 2h with end-over-end agitation. Beads were separated on a magnetic rack and washed 4x in lysis buffer. Beads were resuspended in 350µl RLT buffer (Qiagen RNeasy kit, 74004) containing β-mercaptoethanol, then vortexed for a few seconds. Ribosome-associated RNA was purified according to manufacturer's instructions, with a DNase I in-column digestion step. Finally, the RNA was eluted in 14µl water.

RT-qPCR of RGC transcriptome and translome

RNA concentration and integrity were determined using Bioanalyzer analysis on a PicoChip (Agilent, 5067-1513). Reverse transcription was performed using SuperScript II kit (Invitrogen, 18064022) with equal starting amounts of RNA (4ng) in a final reaction volume of 40µl. qPCR was performed using SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 1725271). The following primers were used: Tox2 forward 5'-ATGGTGACAGTGCCTACGTG-3', Tox2 reverse 5'-AGGGATGGCTCAGGGAGATT-3', Gpr158 forward 5'-AACACAGCCTAGATCCAGAAGAC-3', Gpr158 reverse 5'-GGGTTGTTTGTGATCATCTTTTA-3', Lpcat forward 5'-GTGCACGAGCTGCGACT-3', Lpcat reverse 5'-GCTGCTCTGGCTCCTTATCA-3', Pex19 forward 5'-CAGCAGCACAGCGTCATGGTCA-3', Pex19 reverse 5'-GTTGAGGCCAGGAGGCATCT-3', Rnf112 forward 5'-CACTGCAGGAGACCTGTGC-3', Rnf112 reverse 5'-CCCAGGACAGCCAATAAGCA-3', Surf4 forward 5'-CTGTTGGCCTCATCCTTCGT-3', Surf4 reverse 5'-GGCAATTGTCTGCAGTGCG-3', Tpt1 forward 5'-GGAGCTGCAGAGCAGATTAAG-3', Tpt1 reverse 5'-GTCCAGGAGAGCAACCATAACC-3', Tubb3 forward 5'-GGTGGACTTGGAACCTGGAA-3', Tubb3 reverse 5'-TAAAGTTGTCGGGCCTGAAT-3', Trarg1 forward 5'-GGTCCTTGCCATTGCCTCTT-3', Trarg1 reverse 5'-TGCTGCACACTACTTCGAGAC-3', Wnt2b forward 5'-AACGAGGGGACTTTGACTGG-3', Wnt2b reverse 5'-CCACTCACACCGTGACACTT-3', Gapdh forward 5'-GCATGGCCTTCCGTGTTTC-3', Gapdh reverse 5'-TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT-3', Sdha forward 5'-TGTTTCAGTTCCACCCACACA-3', Sdha reverse 5'-TCTCCACGACACCCTTCTG-3', 18S forward 5'-GCAATTATCCCCATGAACG-3', 18S reverse 5'-GGCCTCACTAAACCATCCAA-3'.

Puro-PLA

For puromycin-PLA, the Duolink PLA kit (Sigma-Aldrich, DUO92013) was used according to manufacturer's instructions and as described above. Sections of mouse retinas previously injected with OPP were first left to defrost at room temperature. Sections were blocked with Duolink Blocking Solution at 37°C for 1h. Primary antibodies used were mouse anti-puromycin (Sigma-Aldrich, MABE343) 1:250, and rabbit anti-Tox2 (Sigma-Aldrich, HPA058396) 1:100 or rabbit anti-Gapdh (Cell Signaling Technology, 2118) 1:250 diluted in Duolink Antibody Diluent and left overnight at 4°C. Secondary antibodies used were minus probe-conjugated anti-mouse (Sigma-Aldrich, DUO92004) and plus probe-conjugated anti-rabbit (Sigma-Aldrich, DUO92002). After PLA reaction, sections were post-fixed for 15min in 4% formaldehyde at room temperature, then processed for immunohistochemistry. Retina sections were imaged with confocal microscopy (Dragonfly spinning disk from Andor). For PLA experiments, the maximum projection of a z-stack of the retina in the region of interest corresponding to the RGC layer was used in each representative image. Regions of interest corresponding to individual

RBPMS-positive cells were randomly defined using Fiji. The number of PLA-positive spots was automatically quantified in these individual cells using Fiji.

Statistical analysis

All quantitative data are expressed as mean \pm standard error of the mean, except polysome data represented as a boxplot with min/max values and line at mean. Unless otherwise specified, in all quantitative data, *n* represents the number of individual events and *N* the number of independent mouse eyes. All datasets were subjected to the Shapiro-Wilk normality test before statistical comparison. For quantification of OPP fluorescence intensity on sections, datasets were subjected to a log-transform for representation and statistical analysis. When applicable, two or more conditions were compared with unpaired t-test or one-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, respectively. To compare directionality of BDNF vesicle transport, a one-sample Wilcoxon signed-rank test was applied, with comparison of median to theoretical value of 0. To compare mRNA levels in mono- and polysomal fractions, a paired t-test was applied. To compare the number of puro-PLA-positive events, a Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons test was applied.

Key resources table

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Guinea-pig polyclonal anti-RBPMS	Millipore	Cat# ABN1376; RRID: AB_2687403
Mouse IgG isotype control	ThermoFisher Scientific	Cat# 31903; RRID: AB_10959891
Mouse monoclonal anti-actin	Sigma-Aldrich	Cat# A1978; RRID: AB_476692
Mouse monoclonal anti-HSP60	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-376240; RRID: AB_10986282
Mouse monoclonal anti-HTT, clone 4c8	Millipore	Cat# MAB2166; RRID: AB_11213141
Mouse monoclonal anti-puromycin	Millipore	Cat# MABE343; RRID: AB_2566826
Mouse monoclonal anti-RPL22	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-373993; RRID: AB_10918294
Mouse monoclonal anti-rRNA, clone Y10b	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-33678; RRID: AB_628226
Mouse monoclonal anti-FLAG	Sigma-Aldrich	Cat# F1804; RRID: AB_262044
Rabbit monoclonal anti-GAPDH	Cell Signaling Technology	Cat# 2118; RRID: AB_561053
Rabbit monoclonal anti-pS6	Cell Signaling Technology	Cat# 4857; RRID: AB_2181035
Rabbit monoclonal anti-RPS6	Cell Signaling Technology	Cat# 2217; RRID: AB_331355
Rabbit polyclonal anti-RPL3	Abcam	Cat# ab228638
Rabbit monoclonal anti-HTT, clone d7F7	Cell Signaling Technology	Cat# 5656; RRID: AB_10827977
Rabbit polyclonal anti-eIF4G	Cell Signaling Technology	Cat# 2498; RRID: AB_2096025
Rabbit polyclonal anti-Histone 3	Cell Signaling Technology	Cat# 9715; RRID: AB_331563
Rabbit polyclonal anti-Pabp1	Cell Signaling Technology	Cat# 4992; RRID: AB_10693595
Rabbit polyclonal anti-Tox2	Sigma-Aldrich	Cat# HPA058396; RRID: AB_2683704
Rabbit anti-SCG10	Novus Biologicals	Cat# NPB1-49461
Mouse anti-Tubulin β III (Tuj1)	Biolegend	Cat# 801202; RRID: AB_10063408
Anti-digoxigenin antibody	Roche	Cat# 11093274910; RRID: AB_2313640
Donkey HRP-conjugated anti-mouse	Thermo Fisher Scientific	Cat# A16011; RRID: AB_2534685
Goat HRP-conjugated anti-rabbit	Proteintech	Cat# SA00001-2; RRID: AB_2722564

Donkey anti-guinea pig Alexa Fluor 647	Jackson Laboratory	Cat# 706-605-148; RRID: AB_2340476
Donkey anti-mouse Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	Cat# A21202; RRID: AB_141607
Goat anti-mouse Alexa Fluor 568	Thermo Fisher Scientific	Cat# A11004; RRID: AB_2534072
Donkey anti-mouse Alexa Fluor 647	Thermo Fisher Scientific	Cat# A31571; RRID: AB_162542
Donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	Cat# A21206; RRID: AB_2535792
Donkey anti-rabbit Alexa Fluor 568	Thermo Fisher Scientific	Cat# a10042; RRID: AB_2534017
Donkey anti-rabbit Alexa Fluor 647	Thermo Fisher Scientific	Cat# A31573; RRID: AB_2536183
Bacterial and virus strains		
AAV2-CMV-Cre	Belin et al., 2015	N/A
AAV2-CMV-Placental alkaline phosphatase (Plap)	Belin et al., 2015	N/A
AAV2-SNCG-RPL22-flag	This study	N/A
AAV2-U6-shTox2	This study	N/A
AAV2-U6-shScrambled	This study	N/A
AAV2-CMV-Tox2-HA	This study	N/A
AAV2-CMV-cRheb	Lim et al., 2016	N/A
AAV2-CMV-BDNF-tdTomato	This study	N/A
AAV8-CMV-Plap	This study	N/A
AAV8-CMV-Cre	This study	N/A
H2B-eGFP	Addgene	Cat# 25999; RRID: Addgene_186627
LV-Cre-GFP	Addgene	Cat# 86805; RRID: Addgene_86805
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
Alexa Fluor 555-conjugated-cholera toxin B subunit (CTB)	Thermo Fisher Scientific	Cat# C22843
cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche	Cat#4693159001
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific	Cat# 31966047
Fetal bovine serum, FBS	Eurobio Scientific	Cat# CVFSVF00-01
Penicillin-streptomycin	Thermo Fisher Scientific	Cat# 15140122
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific	Cat# 25-005-CI
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific	Cat# 25-050-CI
Mouse IgG	Thermo Fisher Scientific	Cat# 31903
Puromycin	Sigma-Aldrich	Cat# P8833
Emetine	Sigma-Aldrich	Cat# E2375
Harringtonin	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-204771
RNase I	Invitrogen	Cat# AM2294

SUPERase In	Invitrogen	Cat# AM2694
NBT-BCIP	Roche	Cat# 11681451001
Duolink blocking buffer	Sigma-Aldrich	Cat# DUO82007
Wash buffer A Duolink	Sigma-Aldrich	Cat# DUO82046
GlycoBlue coprecipitant	Thermo Fisher Scientific	Cat# AM9515
TRIzol Reagent	Invitrogen	Cat# 15596-026
Critical commercial assays		
Protein G magnetic beads, SureBeads	Bio-Rad	Cat# 1614023
SilverQuest silver staining kit	Thermo Fisher Scientific	Cat# 45-1001
OPP labeling kit – Click-iT Plus OPP Alexa Fluor 647 Protein Synthesis Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Cat# C10458
mRNA extraction kit PicoPure	Thermo Fisher Scientific	Cat# 12204-01
mRNA extraction kit miRVana	Thermo Fisher Scientific	Cat# AM1560
PicoPure RNA extraction kit	Thermo Fisher Scientific	Cat# KIT0204
PicoChip	Agilent	Cat# 5067-1513
RNeasy Micro kit	Qiagen	Cat # 74004
SuperScript II kit	Invitrogen	Cat# 18064022
SYBR Green Supermix	Bio-Rad	Cat# 1725271
SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad	Cat# 1725271
Duolink PLA kit	Sigma-Aldrich	Cat# DUO92013
Minus probe-conjugated anti-mouse antibody - Duolink	Sigma-Aldrich	Cat# DUO92004; RRID: AB_2713942
Plus probe-conjugated anti-rabbit antibody - Duolink	Sigma-Aldrich	Cat# DUO92002; RRID: AB_2810940
DIG RNA labelling kit	Roche	Cat# 11175025910
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Cat# 23225
Fast Red TR/Naphthol AS-MX Tablets	Sigma-Aldrich	Cat# F4648
Deposited data		
RNA sequencing data	GeneWiz/ This study	GSE209946
Proteomic data of HTT interactome in mouse brain	Shirasaki et al., 2012	N/A
Experimental models: Cell lines		
Mouse: MEF (Mouse Embryonic Fibroblasts)	This study	N/A
Experimental models: Organisms/strains		
Mouse: HTT floxed	Dragatsis et al., 2000	N/A
Mouse: PTEN floxed	Jackson Laboratory	RRID:IMSR_JAX:004597
Mouse: PTEN floxed HTT floxed	This study	N/A

Mouse: ROSA-tdTomato floxed	Jackson Laboratory	RRID:IMSR_JAX:007914
Mouse: phosphorylated line S421D	Thion et al., 2015	N/A
Mouse: phosphorylated line S1181D/S1201D	M'Barek et al., 2013	N/A
Mouse: phosphorylated line S421A	Thion et al., 2015	N/A
Mouse: phosphorylated line S1181A/S1201A	M'Barek et al., 2013	N/A
Oligonucleotides		
HTT probe for In situ hybridization: nucleotides 346-1614 of mouse HTT mRNA	NCBI	Accession number: NM_010414
Tox2 probe for In situ hybridization: nucleotides 94-853 of mouse Tox2 mRNA	NCBI	Accession number: NM_001098799.2
Primer for In situ hybridization: Tox2 forward: 5'-TCACGAGACACTGGTGCATT-3'	This study	N/A
Primer for In situ hybridization: Tox2 reverse: 5'-AAGGTGGCACTGGGATTCTG-3'	This study	N/A
Primer for shTox2: 5'-GGGCGAGAGTAACGAAGACTA-3'	This study	N/A
Primer for control shRNA: 5'-GCTTACTAACCTCGGCAGT-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Tox2 forward: 5'-ATGGTGACAGTGCCCTACGTG-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Tox2 reverse: 5'-AGGGATGGCTCAGGGAGATT-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: GAPDH forward: 5'-GCATGGCCTTCCGTGTTC-3',	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: GAPDH reverse: 5'-TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Sdha forward: 5'-TGTTCCAGTTCCACCCCA-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Sdha reverse: 5'-TCTCCACGACACCCTTCTG-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: 18S forward: 5'-GCAATTATTCCCATGAACG-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: 18S reverse: 5'-GGCCTCACTAAACCATCCAA-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Firefly luciferase forward: 5'-CATGGAAGACGCCAAAAACAT-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Firefly luciferase reverse: 5'-AATTCTTACACGGCGATCTTT-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Gpr158 forward: 5'-AACACAGCCTAGATCCAGAAGAC-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Gpr158 reverse: 5'-GGGTTGTTTGTGATCATCTTTT-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Lpcat forward: 5'-GTGCACGAGCTGCGACT-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Lpcat reverse: 5'-GCTGCTCTGGCTCCTTATCA-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Pex19 forward: 5'-CAGCAGCACAGCGTCATGGTCA-3'	This study	N/A

Primer for RT-qPCR: Pex19 reverse: 5'-GTTGAGGCCAGGAGGCATCT-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Rnf112 forward: 5'-CACTGCAGGAGACCTGTGC-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Rnf112 reverse: 5'-CCCAGGACAGCCAATAAGCA-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Surf4 forward: 5'-CTGTTGGCCTCATCCTTCGT-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Surf4 reverse: 5'-GGCAATTGTCTGCAGTGCG-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Tpt1 forward: 5'-GGAGCTGCAGAGCAGATTAAG-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Tpt1 reverse: 5'-GTCCAGGAGAGCAACCATAACC-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Tubb3 forward: 5'-GGTGGACTTGGAACCTGGAA-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Tubb3 reverse: 5'-TAAAGTTGTCCGGCCTGAAT-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Trarg1 forward: 5'-GGTCCTTGCCATTGCCTCTT-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Trarg1 reverse: 5'-TGCTGCACACTACTTCGAGAC-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Wnt2b forward: 5'-AACGAGGGGACTTTGACTGG-3'	This study	N/A
Primer for RT-qPCR: Wnt2b reverse: 5'-CCACTCACACCGTGACACTT-3'	This study	N/A
Recombinant DNA		
Plasmid Tox2 ISH probe in pGEMT	This study	N/A
Plasmid HTT ISH probe in pGEMT	This study	N/A
Plasmid for Firefly RNA synthesis in pGEMT	This study	N/A
Software and algorithms		
Zen	Zeiss	RRID: SCR_013672
Fiji	ImageJ	RRID: SCR_002285
IMARIS	Bitplane	RRID: SCR_007370
Metamorph	Molecular Devices	RRID: SCR_002368
STRING version 11.5	Elixir	RRID: SCR_005223
Venny 2.1	BioinfoGP	RRID: SCR_016561
DAVID Bioinformatics Resources 6.8	LHRI	RRID: SCR_001881
STAR	A. Dobin, Github	RRID: SCR_004463
HTSeq-Count	HTSeq	RRID: SCR_005514
edgeR	Bioconductor	RRID: SCR_012802
R	The R project	RRID:SCR_001905
RUVSeq	Bioconductor	RRID:SCR_006263
GraphPad Prism	GraphPad	RRID:SCR_002798
Other		
Polycarbonate tube	Beckman Coulter	Cat# 349622
Ultracentrifuge tubes	Beckman Coulter	Cat# 344059
Plate reader	BMG Labtech	PHERASTAR FS

ChemiDoc	Bio-Rad	Chemidoc MP Imaging System
Gradient Master	BioComp Instruments	Gradient Master
Piston Gradient Fractionator	BioComp Instruments	PGFip
Fraction collector	Teledyne ISCO	FoxyR1
Nanodrop	Thermo Fisher Scientific	Nanodrop One
Cell Sorter	BD Biosciences	Aria II
Tissue Homogenizer	Retsch	Mixer Mill MM400
Confocal Microscope, spinning disk	Andor	Dragonfly

Supplementary Figures

Supplementary Figure 1

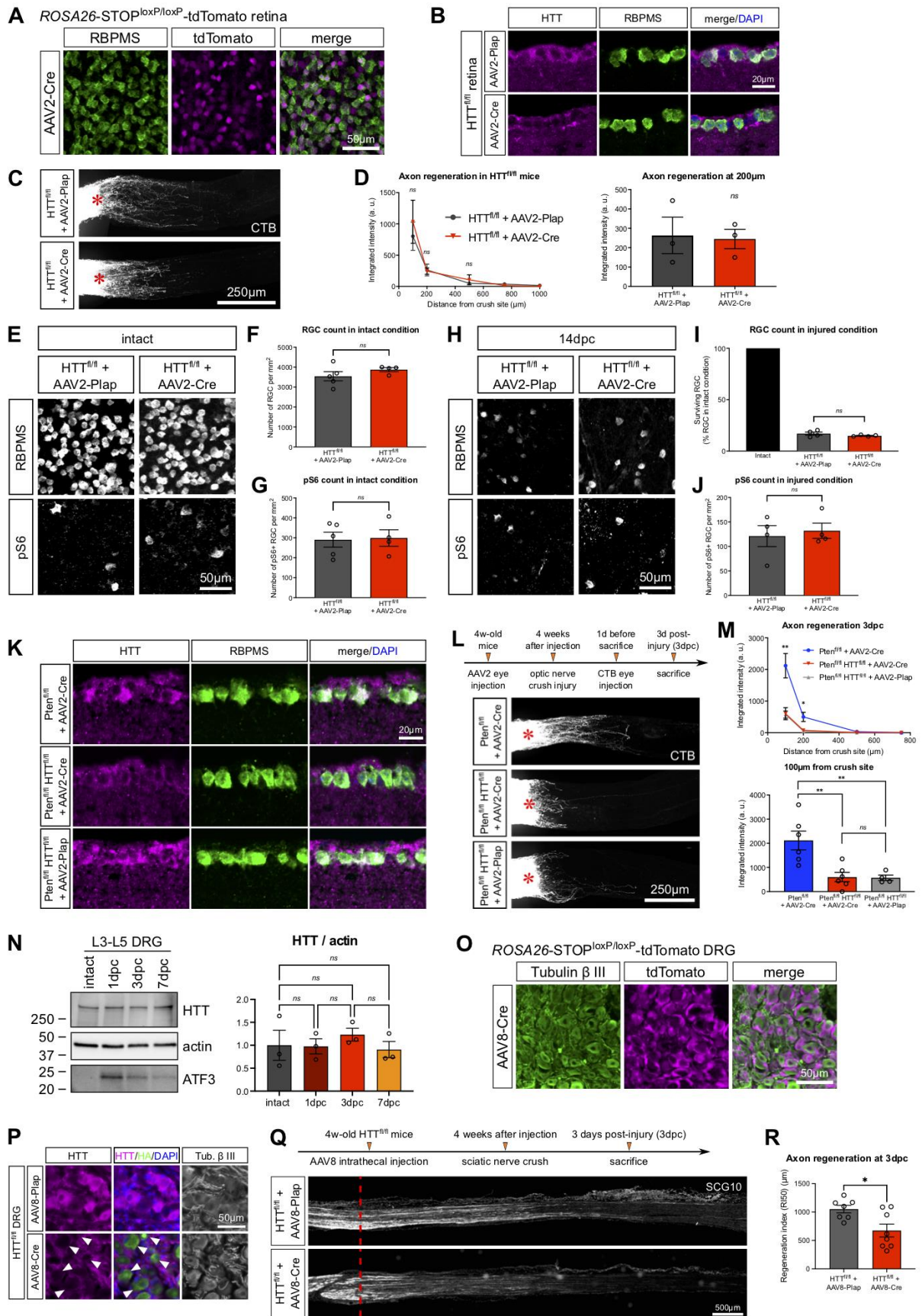


Figure S1: Axon regeneration and RGC survival are not modified by HTT deletion in wild-type condition, related to Figure 1.

(A) Representative confocal image of whole-mount retina of *ROSA26-STOP^{loxP/loxP}-tdTomato* mouse, showing tdTomato expression in RBPMS⁺ RGC.

(B) Representative confocal images showing HTT protein expression in *HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap* and *HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre* RBPMS⁺ RGC.

(C) Whole optic nerve confocal images showing CTB⁺ regenerating axons in *HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap* and *HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre* conditions at 14dpc. The injury site is indicated by a red star.

(D) Quantification of integrated fluorescence intensity along the optic nerve. Unpaired t-test, ns: not significant.

(E) Whole-mount retina confocal images showing RBPMS⁺ RGC and pS6⁺ RGC in *HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap* and *HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre* in intact condition.

(F) Quantification of RBPMS⁺ RGC per mm² retina in intact condition. Unpaired t-test, ns: not significant.

(G) Quantification of pS6⁺ RGC per mm² retina in intact condition. Unpaired t-test, ns: not significant.

(H) Whole-mount retina confocal images showing RBPMS⁺ and pS6⁺ RGC in *HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap* and *HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre* conditions at 14dpc.

(I) Quantification of RBPMS⁺ RGC as a percentage of intact RBPMS⁺ RGC at 14dpc. Unpaired t-test, ns: not significant.

(J) Quantification of pS6⁺ RGC per mm² retina at 14dpc. Unpaired t-test, ns: not significant.

(K) Representative confocal images showing HTT protein expression in *Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre*, *Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre* and *Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap* intact RBPMS⁺ RGC.

(L) Schematic timeline and representative results of optic nerve crush injury experiment. Whole optic nerve confocal images showing CTB⁺ regenerating axons in *Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre*, *Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre* and *Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap* conditions at 3dpc. The injury site is indicated by a red star.

(M) Quantification of integrated fluorescence intensity along the optic nerve. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, *p-value<0.05, **p-value<0.01, ***p-value<0.001, ns: not significant. The top graph gives the multiple comparisons test between *Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre* and *Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre* conditions.

(N) Immunoblot and quantification of L3 to L5 DRG lysate showing HTT, actin and ATF3 protein expression in intact condition and at different timepoints after sciatic nerve injury. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, ns: not significant.

(O) Representative epifluorescence image of DRG section from *ROSA26-STOP^{loxP/loxP}-tdTomato* mouse, injected intrathecally with *AAV8-Cre*, showing tdTomato expression in Tubulin β III⁺ DRG neurons.

(P) Representative epifluorescence images showing HTT protein expression in *HTT^{fl/fl}+AAV8-Plap* and *HTT^{fl/fl}+AAV8-Cre* DRG. Neurons infected with *AAV8-Cre* are HA⁺.

(Q) Epifluorescence images showing regeneration of DRG axons in the sciatic nerve in $HTT^{fl/fl}+AAV8$ -Plap and $HTT^{fl/fl}+AAV8$ -Cre at 3dpc. Regenerating axons are labeled with anti-SCG10 antibody. The injury site is indicated by a red dashed line.

(R) Quantification of the regeneration index calculated as the distance to the injury site for which axon regeneration is 50% of the intact region. Unpaired t-test, *p-value<0.05.

Supplementary Figure 2

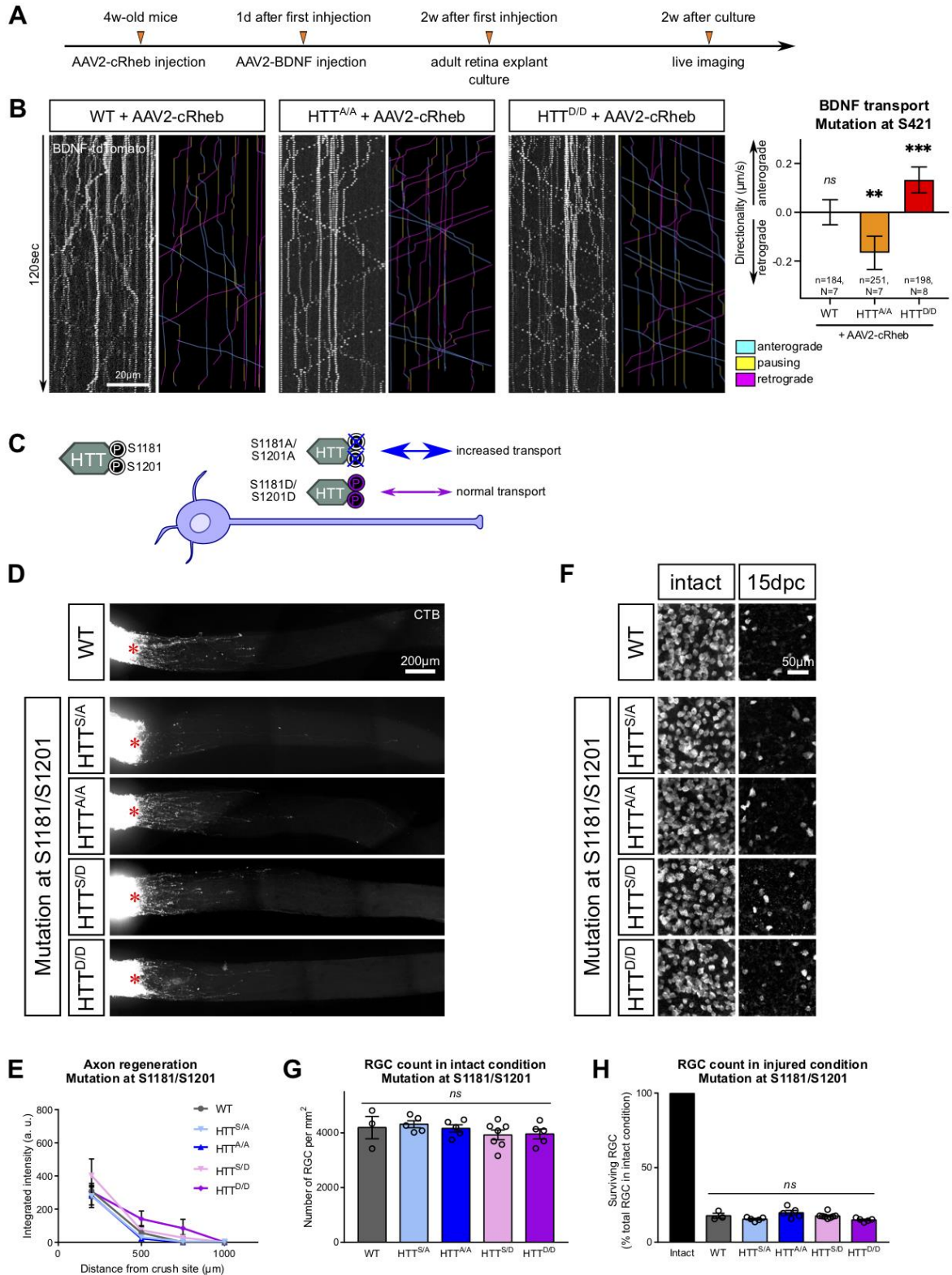


Figure S2: Axon regeneration and RGC survival are not modified by S1181/S1201 phospho-mutations responsible for HTT-mediated control of BDNF transport, related to Figure 2.

(A) Schematic timeline of adult retina explant culture set-up.

(B) Representative kymographs of BDNF vesicle transport in WT axons or in axons from HTT phospho-mutant mice (mutation at S421, A/A or D/D). Quantification of directionality. Data are represented as mean \pm standard error of the mean, with n the number of vesicles and N the number of independent axons. Wilcoxon signed-rank test with comparison of median to theoretical value of 0, **p-value<0.01, ***p-value<0.001.

(C) Schematic representation of transgenic mouse lines carrying S1181/S1201 phospho-point mutations¹³.

(D) Whole optic nerve confocal images showing CTB⁺ regenerating axons in phospho-mutant mouse lines at 15dpc. The injury site is indicated by a red star.

(E) Quantification of integrated fluorescence intensity along the optic nerve.

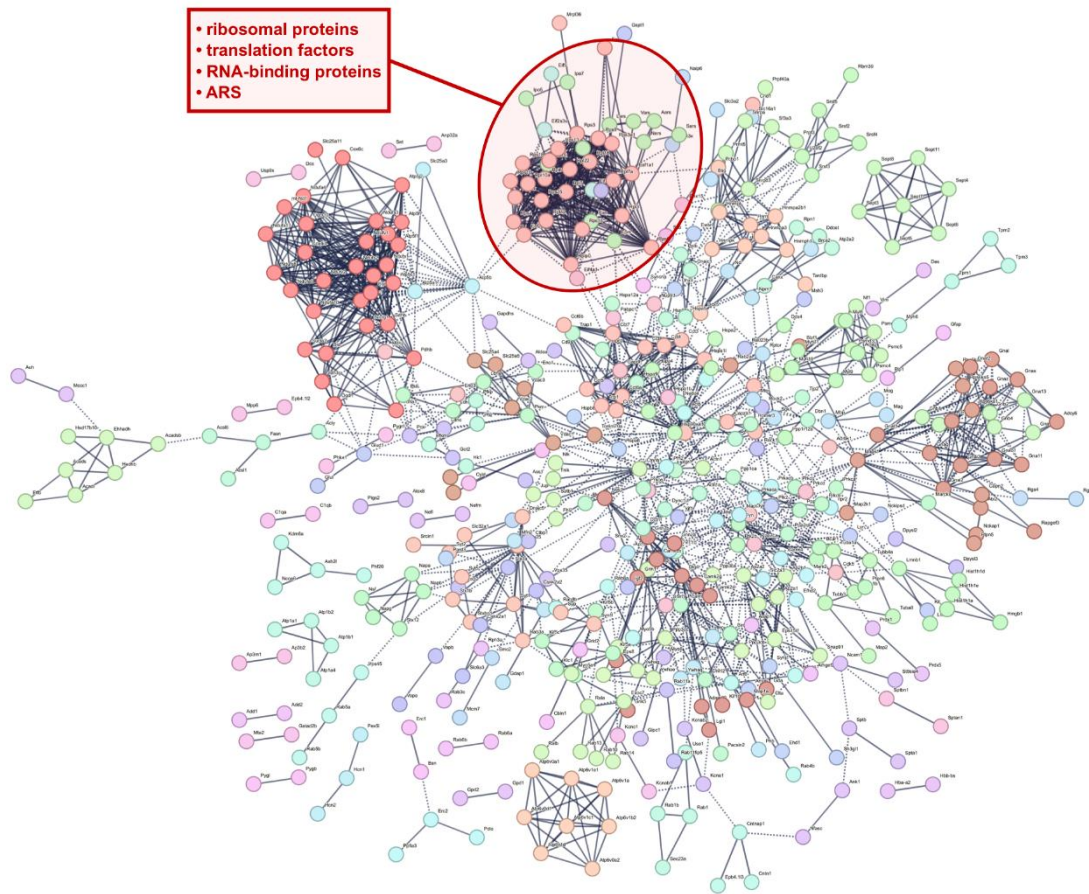
(F) Whole-mount retina confocal images showing RBPMS⁺ RGC in phospho-mutant mouse lines in intact and 15dpc conditions.

(G) Quantification of RBPMS⁺ RGC per mm² retina in intact condition. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, ns: not significant.

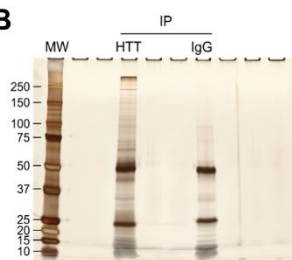
(H) Quantification of RBPMS⁺ RGC as a percentage of intact RBPMS⁺ RGC. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, ns: not significant.

Supplementary Figure 3

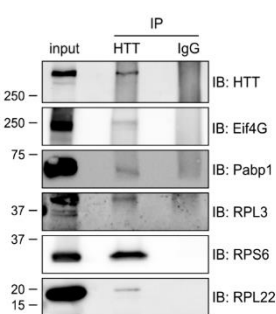
A



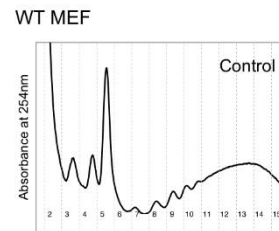
B



C



D



E

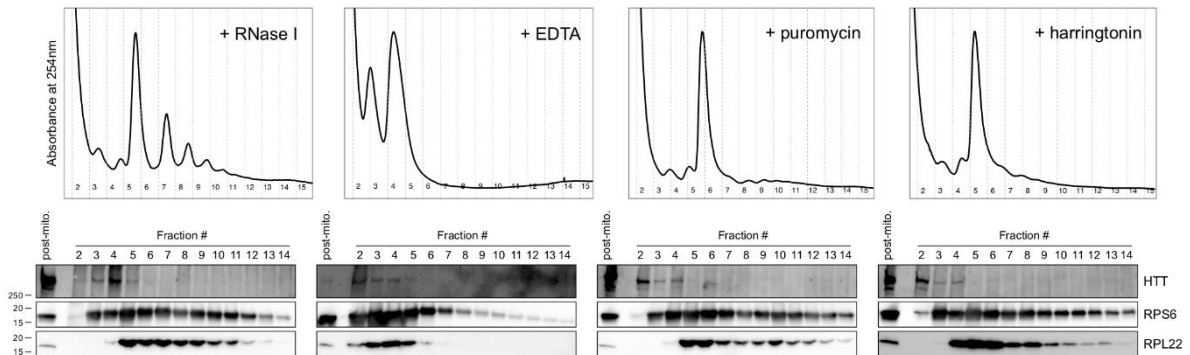


Figure S3: HTT binding partners include components of the translation machinery, related to Figure 3.

(A) STRING interactome of 747 HTT binding partners identified by affinity purification and mass spectrometry analysis by Shirasaki and colleagues²⁸. Network edges represent confidence with minimum interaction score of 0.9 (highest confidence). Disconnected nodes in the network are hidden from the representation. ARS: aminoacyl tRNA synthetases. A high-resolution version of this graph is available in **Supplementary Table 1**.

(B) Silver staining of anti-HTT immunoprecipitated proteins versus IgG control from WT MEF lysate.

(C) Immunoblot of proteins immunoprecipitated with anti-HTT from WT MEF lysate.

(D) Representative polysome profile of WT MEF on a 15-50% sucrose gradient.

(E) Representative polysome profile of WT MEF on a 15-50% sucrose gradient, with previous treatments of cells (puromycin, harringtonin) or lysates (EDTA, RNase I). Corresponding immunoblots showing HTT distribution in the different fractions.

Supplementary Figure 4

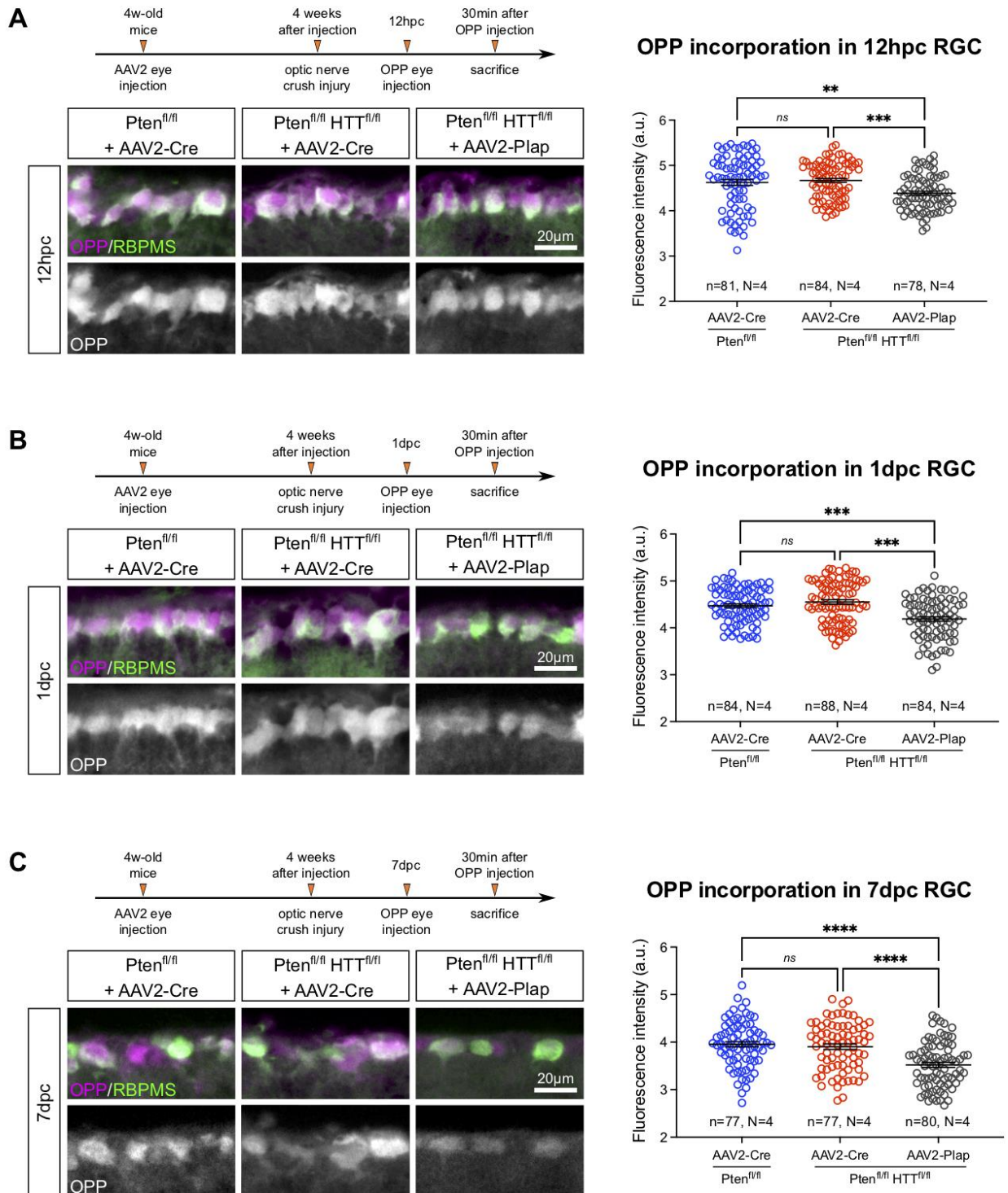


Figure S4: HTT deletion does not modify global translation in injured Pten-deleted RGC, related to Figure 4.

(A) Representative images and quantification of OPP incorporation in $Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre$, $Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre$ and $Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap$ RGC at 12hpc. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, **p-value<0.01, ***p-value<0.001, ns: not significant.

(B) Representative images and quantification of OPP incorporation in $Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre$, $Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre$ and $Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap$ RGC at 1dpc. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, ***p-value<0.001, ns: not significant.

(C) Representative images and quantification of OPP incorporation in $Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre$, $Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre$ and $Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap$ RGC at 7dpc. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, ***p-value<0.001, ns: not significant.

Supplementary Figure 5

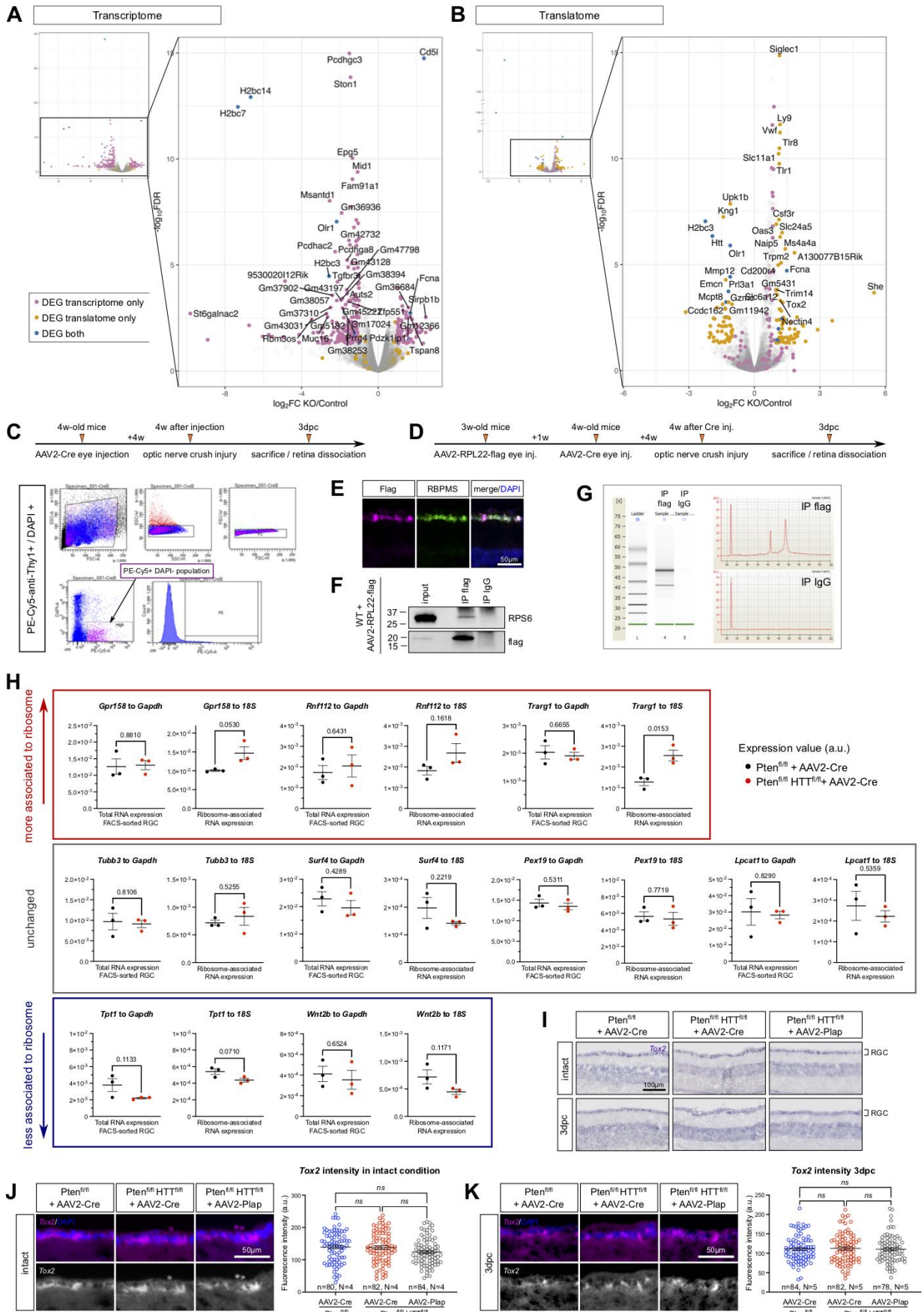


Figure S5: Comparison of transcriptome and translome in control and HTT KO MEF shows mRNA-specific regulation of translation, related to Figure 5.

(A) Volcano plot showing $-\log_{10}(\text{FDR-adjusted p-value})$ as a function of the $\log_2(\text{fold-change HTT-KO versus control})$ in total RNA samples. Blue hits: FDR-corrected p-value < 0.05 and $|\log_2(\text{fold-change})| > 1$ in both datasets. Pink hits: FDR-corrected p-value < 0.05 and $|\log_2(\text{fold-change})| > 1$ in transcriptome only. Orange hits: FDR-corrected p-value < 0.05 and $|\log_2(\text{fold-change})| > 1$ in translome only.

(B) Volcano plot showing $-\log_{10}(\text{FDR-adjusted p-value})$ as a function of the $\log_2(\text{fold-change HTT-KO versus control})$ in translated RNA samples.

(C) Schematic timeline of RGC cell sorting from $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}+\text{AAV2-Cre}$ versus $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}\text{HTT}^{\text{fl/fl}}+\text{AAV2-Cre}$ retinas. Representative FACS plots illustrating the steps of RGC isolation. Dissociated retinal cells are gated based on size and surface characteristics (forward scatter, FSC; side scatter, SSC). PE-Cy5-Thy1-positive DAPI-negative population was selected. Double negative staining of retinal cells was used as a control to set up the threshold for PE-Cy5 and DAPI.

(D) Schematic timeline of ribosome immunoprecipitation from RGC of $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}+\text{AAV2-Cre}$ versus $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}\text{HTT}^{\text{fl/fl}}+\text{AAV2-Cre}$ retinas.

(E) Representative immunofluorescence image showing flag expression in RBPMS^+ RGC of AAV2-RPL22-flag-injected mice.

(F) Representative immunoblot of anti-flag- and control IgG-immunoprecipitated proteins from retina lysate of WT mice injected with RPL22-flag.

(G) Representative Bioanalyzer profiles of translated RNA isolated after anti-flag and control IgG immunoprecipitation.

(H) RT-qPCR analysis of selected mRNA levels in total RNA samples and in ribosome-associated RNA samples. For each tested mRNA, the expression level is normalized to *Gapdh* level for total RNA isolated from FACS-sorted RGC; and *18S* level in ribosome-associated RNA fraction. Levels are compared between $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}+\text{AAV2-Cre}$ and $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}\text{HTT}^{\text{fl/fl}}+\text{AAV2-Cre}$ conditions at 3dpc. The p-value corresponding to unpaired t-test is displayed on each graph.

(I) In situ hybridization showing *Tox2* mRNA expression in $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}+\text{AAV2-Cre}$, $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}\text{HTT}^{\text{fl/fl}}+\text{AAV2-Cre}$ and $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}\text{HTT}^{\text{fl/fl}}+\text{AAV2-Plap}$ in intact and 3dpc conditions.

(J) Fluorescent in situ hybridization and quantification of *Tox2* mRNA expression in $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}+\text{AAV2-Cre}$, $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}\text{HTT}^{\text{fl/fl}}+\text{AAV2-Cre}$ and $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}\text{HTT}^{\text{fl/fl}}+\text{AAV2-Plap}$ intact RGC. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, ns: not significant.

(K) Fluorescent in situ hybridization and quantification of *Tox2* mRNA expression in $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}+\text{AAV2-Cre}$, $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}\text{HTT}^{\text{fl/fl}}+\text{AAV2-Cre}$ and $\text{Pten}^{\text{fl/fl}}\text{HTT}^{\text{fl/fl}}+\text{AAV2-Plap}$ at 3dpc. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test, ns: not significant.

Supplementary Figure 6

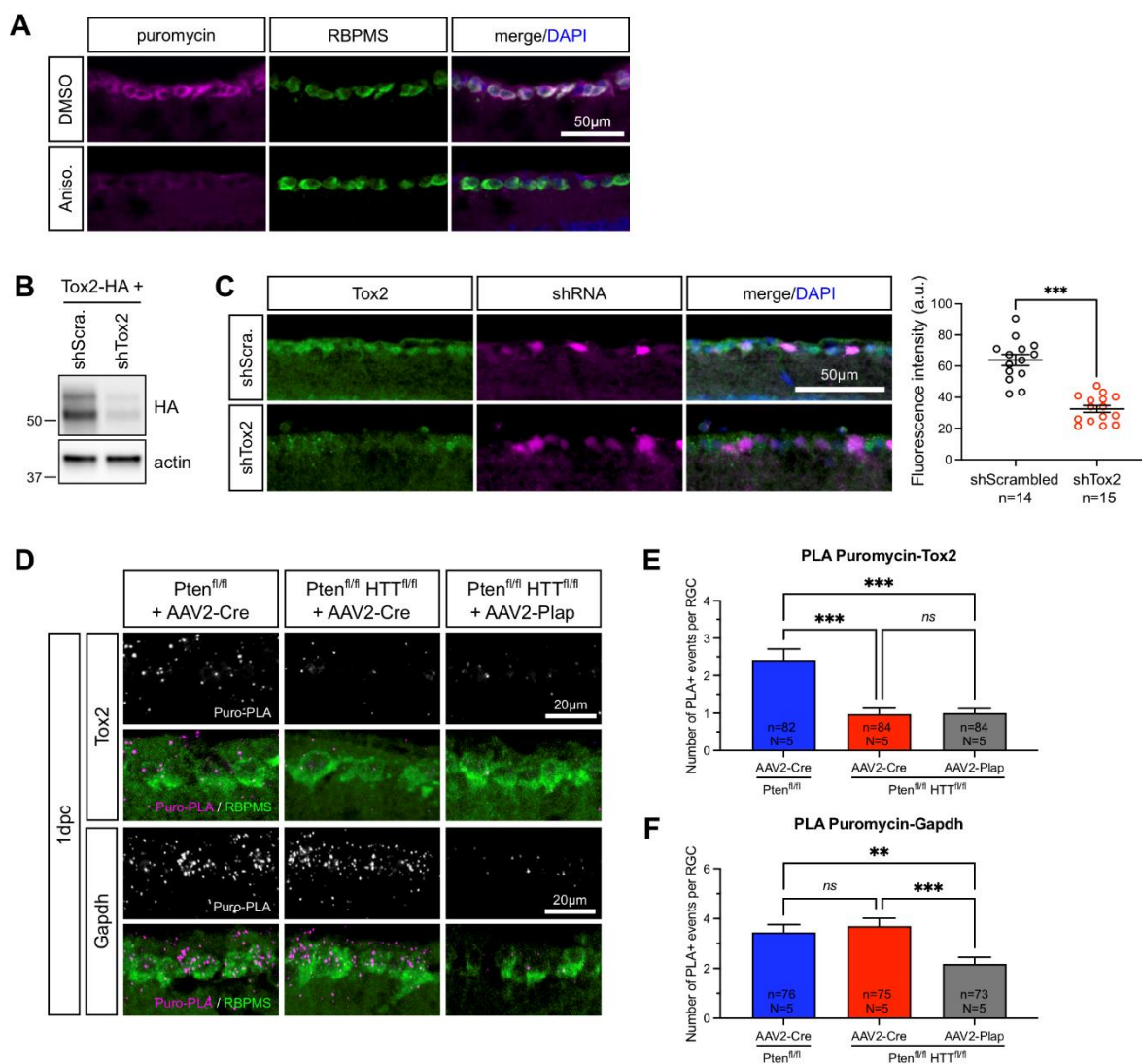


Figure S6: Tox2 is translationally-regulated by HTT in vivo after injury, related to Figure 6.

(A) Representative immunofluorescence images using anti-puromycin antibody in WT RGC with DMSO or Anisomycin injection, and with OPP injection 30min before sacrifice. Unpaired t- test, **p-value<0.01, ns: not significant.

(B) Validation of shRNA against Tox2 (shTox2) by immunoblot using overexpression of Tox2-HA in mouse N2A cells.

(C) Validation of shRNA against Tox2 (shTox2) by immunofluorescence with anti-Tox2 antibody in mouse RGC. Quantification of immunofluorescence intensity in individual RGC expressing shScrambled or shTox2 (mCherry⁺ cells). Unpaired t-test, ***p-value<0.001.

(D) PLA staining confocal images for puromycin-Tox2 or puromycin-Gapdh in Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre, Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre and Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap RGC at 1dpc.

(E) Quantification of puromycin-Tox2 PLA-positive events in $Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre$, $Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre$ and $Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap$ RGC at 1dpc. Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons test, ***p-value<0.001, ns: not significant.

(F) Quantification of puromycin-Gapdh PLA-positive events in $Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre$, $Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre$ and $Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Plap$ RGC at 1dpc. Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons test, **p-value<0.01, ***p-value<0.001, ns: not significant.

Supplementary Figure 7

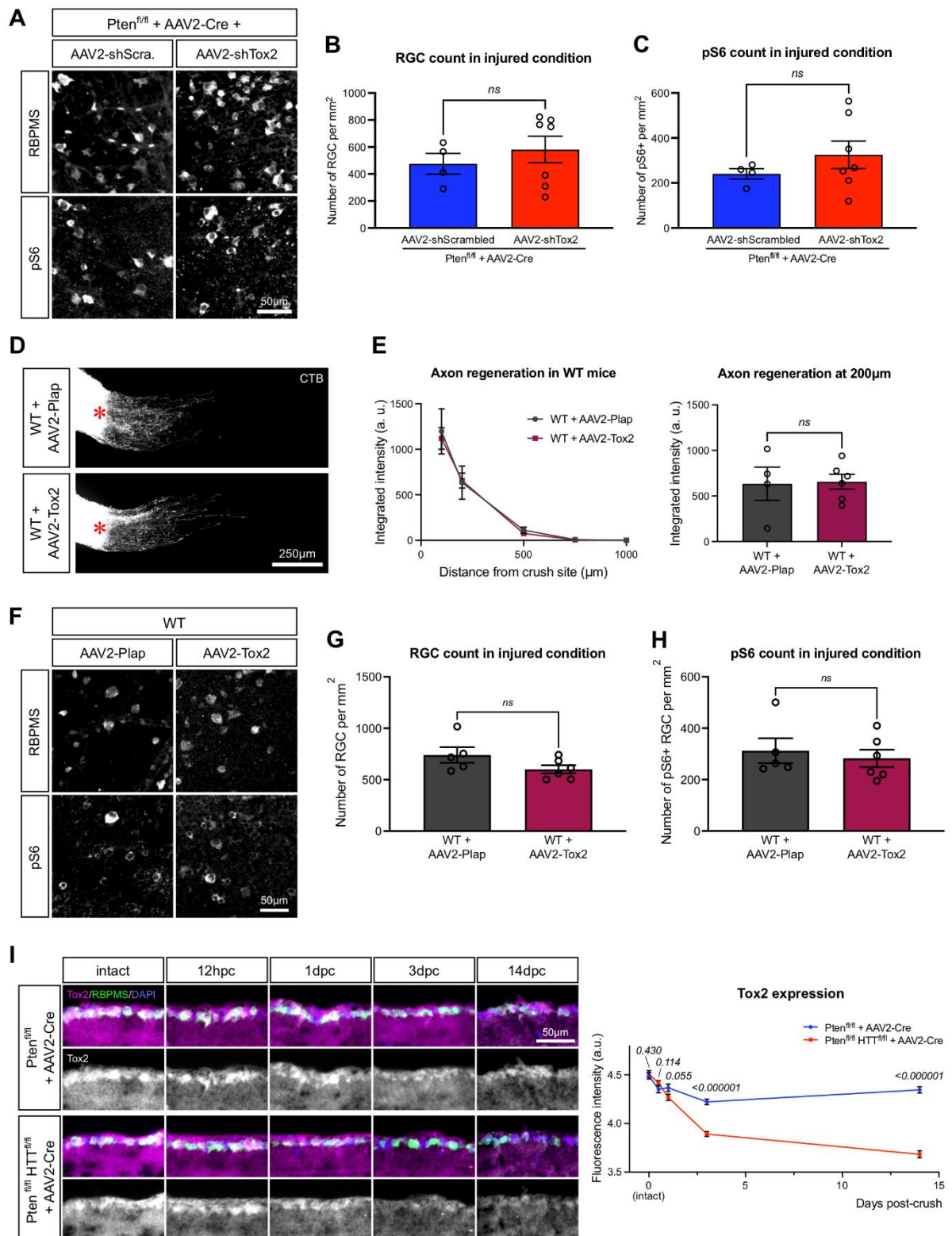


Figure S7: Regulation of Tox2 translation by HTT is necessary but not sufficient to promote axon regeneration in vivo, related to Figure 7.

- (A) Whole-mount retina confocal images showing RBPMS⁺ RGC and pS6⁺ RGC in Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre+AAV2-shScrambled and in Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre+AAV2-shTox2 at 14dpc.
- (B) Quantification of RBPMS⁺ RGC per mm² retina at 14dpc. Unpaired t-test, ns: not significant.
- (C) Quantification of pS6⁺ RGC per mm² retina at 14dpc. Unpaired t-test, ns: not significant.
- (D) Whole optic nerve confocal images showing CTB⁺ regenerating axons WT+AAV2-Plap and WT+AAV2-Tox2 conditions at 14dpc. The injury site is indicated by a red star.
- (E) Quantification of integrated fluorescence intensity along the optic nerve. Unpaired t-test, ns: not significant.
- (F) Whole-mount retina confocal images showing RBPMS⁺ RGC and pS6⁺ RGC in WT+AAV2-Plap and in WT+AAV2-Tox2 at 14dpc.
- (G) Quantification of RBPMS⁺ RGC per mm² retina at 14dpc. Unpaired t-test, ns: not significant.
- (H) Quantification of pS6⁺ RGC per mm² retina at 14dpc. Unpaired t-test, ns: not significant.
- (I) Representative immunofluorescence images showing Tox2 protein expression in Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre and Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre retinas, in intact condition and at 12hpc, 1dpc, 3dpc and 14dpc. Quantification of Tox2 immunofluorescence intensity in Pten^{fl/fl}+AAV2-Cre and Pten^{fl/fl}HTT^{fl/fl}+AAV2-Cre retinas, in intact condition and at 12hpc, 1dpc, 3dpc and 14dpc. Multiple t-tests with two-stage step-up method of Benjamini, Krieger and Yekutieli were performed. For each timepoint, the FDR-corrected q-value is displayed.

Supplementary Table 1: List of HTT binding partners identified by Shirasaki et al., 2012, and submitted to STRING analysis, related to Supplementary Figure 3.

Supplementary Table 2: Differential expression analysis of gene hits for total RNA (TOT) and ribosome-associated RNA (TRANSLAT), comparing HTT-deleted versus control MEF, related to Figure 5 and Supplementary Figure 5.

ANNEXE n°2

Visual system repair: what's next?

Perspective publiée dans le journal Neural Regeneration Research

Avril 2022

Noemie Vilallongue & Homaira Nawabi

Visual system repair: what's next?

Noemie Vilallongue, Homaira Nawabi*

One of the hallmarks of the mature neurons from the central nervous system (CNS) is their inability to grow their axons after an insult. In turn, whenever a neuronal circuit is damaged, either by a neurodegenerative disease or a traumatic injury, the motor and/or cognitive functions associated with it are lost permanently. Therefore, understanding the molecular and cellular barriers to CNS repair is a major challenge not only for Neurosciences but also for public health.

Regrowing mature axons has been the limiting step in the field of CNS regeneration for many years. Indeed, for a long time, studies focused only on the inhibitory role of the environment (glial scar and myelin debris), but its manipulation resulted on moderate growth (He and Jin, 2016). Ten years ago, the discovery of the critical role of neurons themselves has been a game changer leading to extensive axonal regeneration: from the eye to the brain in the visual system (Belin et al., 2015; He and Jin, 2016). In addition, it has been shown recently that regenerating axons can be myelinated using a combination of drugs (Wang et al., 2020). This is a critical milestone to reach the functionality of the regenerating circuit.

Despite all those achievements, functional recovery remains challenging. As a matter of fact, the huge diversity of neuron populations as well as their different capabilities to survive, to regenerate, to reach their targets after the injury represent a major roadblock to build functional circuits (Figure 1). We will discuss all these remaining challenges in this perspective.

Diversity of neuronal populations: In the nervous system, many different types of neurons co-exist and interact in a tight coordination in order for the body to function smoothly. Interestingly recent data reveal that each neuronal population will show a specific response to injury and might need its own molecular cocktail to be able to grow axons.

Neurons show different rates of survival after the injury, even within the same region of the nervous system. A detailed analysis of neuronal behavior upon axon

lesion shows that in the retina some neurons are more resilient than others (Figure 1). The retina, that belongs to the CNS, is the organ that perceives the visual stimuli. Visual information is conveyed by axons of the retinal ganglion cells (RGC) that form the optic nerve, the only bridge between the eye and the brain. At least 30 subtypes of RGC have been described so far, characterized by the specific expression of molecular markers, anatomical localization, specificity of neuronal target or visual function (Figure 1) (Sanes and Masland, 2015).

Indeed, RGC can be classified according to their function. In one hand, specific subtypes of RGC support each aspect of the vision (image-forming function): light intensity, motion rate, direction. For example, the ON-OFF directionally selective ganglion cells (ooDSGC), expressing specifically the marker CART (cocaine-and amphetamine regulated transcript) respond to both increase and decrease of light intensity but also have directional preference in motion. In another hand, other RGC are specialized in non-image forming functions. In this regard, the ipRGC (intrinsically photosensitive RGC) express the melanopsin photopigment allowing them to naturally detect light and regulate the photoentrainment of circadian rhythms (Figure 1).

Interestingly, each RGC subpopulation responds differently to axon injury. Indeed, within only 2 weeks after optic nerve injury, as much as 80% of RGC undergo apoptosis. Duan and colleagues (Duan et al., 2015) used reporter lines and immunostaining to follow the fate of several RGC subtypes after axon lesion. The alpha-RGC that specifically innervate the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) and the superior colliculus at eye opening, are surviving extremely well even 28 days post optic nerve lesion (around 80%). The M1 subtype of ipRGC that project to the suprachiasmatic nucleus (SCN), ensuring its role of master regulator of circadian rhythms, are also able to bear very well axon lesion as 70% of injured M1-RGC are surviving. A recent single cell profiling study addressed the resilient potential to injury of different RGC subpopulations. With this approach,

authors were able to distinguish 46 transcriptionally different subtypes of RGC (Tran et al., 2019). Using this atlas, they confirmed that 2 out of 4 subtypes of alpha-RGC and all ipRGC are resilient upon injury. In contrast to dying RGC, resilient RGC keep their dendritic morphology and complexity, suggesting that their functions are unaltered even if their axons are lesioned. Another remarkable feature of resilient neurons comes from their firing rate: indeed, those neurons present a sustained response as it has been already reported for surviving motoneurons in the spinal cord, in the context of amyotrophic lateral sclerosis.

However, some other RGC subpopulations are most sensitive to the lesion, such as the W3-RGC that are among the smallest in terms of soma size but among the most abundant RGC that show only 10% of survival. Moreover, a novel class of RGC called N-RGC which expresses transcription factors *Neurod2* and *Satb2* also seems to be highly susceptible to injury (Tran et al., 2019). Finally, ooDSGC present few if any survival even 14 days after injury (Duan et al., 2015).

Besides their survival potential, neurons also show different rates of regeneration after the injury: mostly alpha-RGC and ipRGC are believed to regenerate well (Bray et al., 2019). Molecular wise, it is rather difficult to pinpoint precisely universal molecules that could predict resilience and regeneration rates. However, overexpression of some molecules such as *Thrombospondin* (as it was already been reported in Bray et al., 2019), *urocortin (Ucn)*, *Timp2* or *Mmp12* globally improve the survival of RGC that were not expressing them originally. Strikingly, not all the RGC respond to the molecular manipulations (Duan et al., 2015; Tran et al., 2019). It appears that each subpopulation of neuron has its own degree of molecular flexibility that allows it to launch survival and even growth programs. One elegant demonstration comes from the manipulation of the transcription factor *Sox11* (Norsworthy et al., 2017) expressed in differentiating retinal progenitors. Overexpression of *Sox11* induces axon regeneration of some populations of mature neurons while killing others. Indeed, the forced increase of *Sox11* levels is toxic for alpha-RGC. Interestingly, alpha-RGC are among the few in the retina that respond positively to the mTOR pathway activation (either by *Pten* deletion or the overexpression of

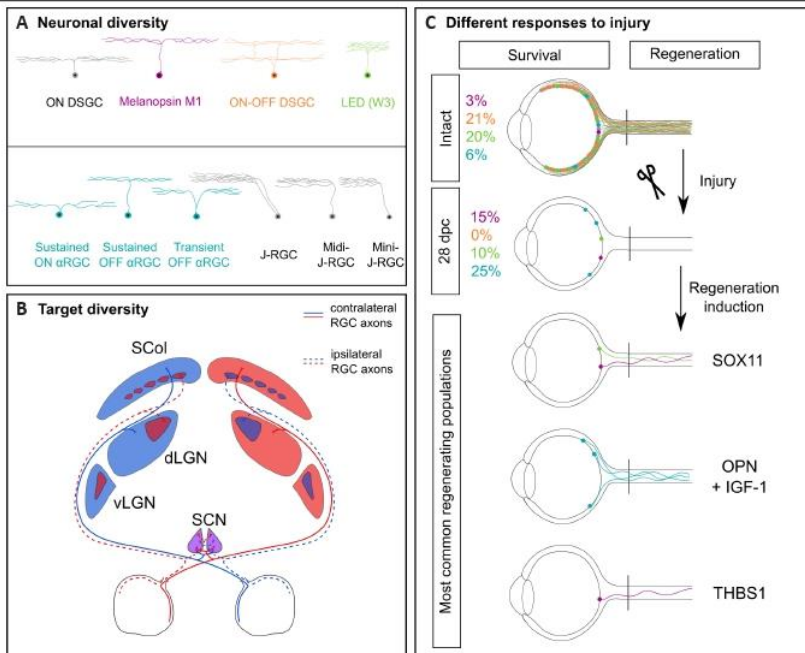


Figure 1 | Roadblocks to achieve functional recovery after axon regeneration. (A) Retinal ganglion cells (RGC) are a diverse population of neurons with different regenerative potentials. Melanopsin M1 RGC (purple), ON-OFF DSGC (orange), W3-RGC (green) and α -RGC (blue). In gray: DSGC: directionally selective ganglion cells; LED: local edge detector; J-RGC: junctional adhesion molecule B-positive RGC. Inspired by Sanes & Masland, 2015. (B) Different brain targets innervated by binocular RGC inputs. Superior colliculus (SCol), dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN), ventral lateral geniculate nucleus (vLGN) are mainly innervated by contralateral RGC and little territories from these targets are connected by ipsilateral RGC. RGC innervating both suprachiasmatic nucleus (SCN) equally by sending two collaterals from the same axon. (C) RGC show different responses to injury. In intact condition, Melanopsin M1 RGC (purple) represent 3% of the total RGC (in grey); 21% are ON-OFF DSGCs (orange); 20% are W3-RGC (green) and 6% are α -RGC (blue). 28 days after the optic nerve crush, M1 RGC and α -RGC display the greatest surviving rate (15% of remaining RGC are M1-RGC and 25% are α -RGC). Whereas, all ON-OFF DSGCs die and W3-RGC represent 10% of the total remaining RGC. Different regeneration models show different RGC responses. Sox11 overexpression allow the M1 RGC and W3-RGC regeneration while killing remaining α -RGC (Northworthy et al., 2016). OPN and IGF-1 overexpression leads to α -RGC regeneration (Duan et al., 2015). THBS1 overexpression leads to Melanopsin M1 RGC only (Bray et al., 2019). IGF-1: Insulin-like growth factor 1; OPN: osteopontin; THBS1: thrombospondin-1.

IGF-1 (Duan et al., 2015). The combination of mTOR activation and Sox11 induces some long-distance regeneration from RGC subpopulations that were originally insensitive to mTOR activation (Figure 1) (Northworthy et al., 2017).

Altogether, these findings shed the light on the nervous system complexity in terms of heterogeneity. So far, it is not clear how many neurons are needed in terms of survival and regeneration in order to reach the threshold for sufficient activation of their post-synaptic partners and ensure visual functions. Moreover, the wide range of functions provided by the different RGC subpopulations has to be operational to allow functional recovery. To this end, it is essential to find ways to allow the survival and the growth of most RGC subtypes. The next step would be to ensure that growing axons form the original topographic maps.

Connectivity within the brain targets: The visual system is formed by the

axonal projections of both eyes. During development, the connectivity between the eyes and the brain is tightly regulated in order to draw stereotypical topographic maps that allow binocular vision. Indeed, each eye will project to both sides of the brain and the degree of 3D vision is correlated with the percentage of segregation between crossing and non-crossing RGC axons. When axons reach the distal part of the optic nerve, they face a choice point called the optic chiasm: in mice, 10% of axons stay in the ipsilateral side, while almost 90% will cross the midline. In human, 50% of axons cross the midline. After the optic chiasm most of the axons will travel within the optic tracts to reach one of the 13 main brain targets.

The SCN is located in the ventral part of the hypothalamus, just above the optic chiasm, and is the closest visual target to the eye. As described before, the SCN is innervated by the M1-ipRGC that represent about 3% of the RGC neurons.

Unlike other brain regions, each SCN is innervated equivalently by both eyes: indeed, each ipRGC axon will be divided into two branches to innervate ipsilateral and contralateral SCN (Fernandez et al., 2016). Thus, if ipRGC are able to regenerate, one must verify whether the programs that drive axon branching during development are still effective in the mature regrowing axons and whether the patterns of SCN reinnervations correspond to the ones establish during development.

For the other targets, the most studied ones are the Thalamus (mostly the dLGN) and the superior colliculus. Those regions are located deeper into the brain and axons need to travel within the optic tract to reach them. They receive also projections from both eyes but here the RGC projecting ipsilaterally are less abundant than the contralateral RGC and there is a segregation of the territories they occupy. At birth the projections from both eyes overlap in those brain targets. However, within few days after eye opening (around post-natal day 12 in mouse), the dLGN peripheral domain is only connected by the contralateral eye and the central domain by the ipsilateral eye (Figure 1B). The pruning of those unwanted connections is regulated by neuronal activity and mediated by microglia (Schafer et al., 2012). Therefore, it would be interesting, for example, to address how the innervation of dLGN occurs during regeneration: will the projections be segregated directly or whether as during development, a pruning step would be needed?

Moreover, it is now well documented that axon lesion induces changes within the glia. For example, it has been recently shown that microglia is transcriptionally different in immature versus mature CNS and regulates differently the regenerative outcome (Li et al., 2020). Indeed, while glia is responsible for a scar formation in the adult, inhibiting regeneration (physical barrier and secretion of inhibitory factors), a scar-free wound-healing response takes place two weeks after the injury in P2 animals. In this context, one question is whether microglia is still able to resume its activities in denervated regions of the brain to the same extent as in young animals.

Finally, the guidance of regenerative fibers is still an open question in the field. During development, neurons are paired to their proper partners through a mechanism called axon guidance. In this

Perspective

time window, the environment expresses diverse molecules that give topographic information to growing axons and help them to travel over long distances to reach their final targets. In mature nervous system this road map is completely reset. Therefore, it came with no surprise that growing axons in the mature nervous system present strong guidance defects. It is now very commonly described that a large number of regenerative axons displays misprojections: within the optic nerve, some will turn towards the eye ball, stall at the optic chiasm, won't respect the ipsilateral- contralateral segregation or will enter into the brain randomly (Belin et al., 2015). Those axons compromise strongly any attempt for functional recovery. Not only do they fail to reform the original neuronal circuit but they might also form aberrant circuits that will interfere with functional recovery. For instance, Sox11 overexpression in the somatosensory cortex induces the regeneration of the corticospinal axons after spinal cord injury. However, when the behavior outcome was tested, these animals were less performant than the controls (Wang et al., 2015). Thus, axon regeneration is not sufficient by itself to promote CNS repair.

Conclusion: Great progress has been accomplished to unlock molecular and cellular mechanisms of CNS regeneration. The visual system has been an important study model to identify those players. However, there are still many challenges ahead of us in order to reach the ultimate goal in the field: sustained functional recovery. To this end, helping axons to grow is not enough anymore. The next step would be to induce the growth of most of neurons and this regeneration should be controlled by considering the heterogeneity in neuronal injury response and potential for survival and regeneration. Regenerative axons should be paired with their correct targets and those circuits should be consolidated through time to ensure long-lasting functional recovery.

We would like to apologize for authors whose work could not be included due to space limitation.

We thank Julia Schaeffer and Stephane Belin for their critical reading of the manuscript.

The present work was supported by ERC-St17-759089-DRIVE and NRJ Foundation (to HN).

Noemie Vilallongue, Homaira Nawabi*

Univ. Grenoble Alpes, Inserm, Grenoble Institut Neurosciences, Grenoble, France

*Correspondence to: Homaira Nawabi, PhD, homaira.nawabi@inserm.fr.

<https://orcid.org/0000-0003-3155-2783>

(Homaira Nawabi)

Date of submission: February 25, 2021

Date of decision: March 30, 2021

Date of acceptance: May 27, 2021

Date of web publication: August 30, 2021

<https://doi.org/10.4103/1673-5374.323076>

How to cite this article: Vilallongue N, Nawabi H (2022) Visual system repair: what's next? *Neural Regen Res* 17(4):800-802.

Copyright license agreement: *The Copyright License Agreement has been signed by both authors before publication.*

Plagiarism check: *Checked twice by iThenticate.*

Peer review: *Externally peer reviewed.*

Open access statement: *This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.*

Open peer reviewers: *Colin Barnstable, Pennsylvania State University, USA; Toshiyuki Oshitari, Chiba University, Japan.*

Additional file: *Open peer review report 1.*

References

- Belin S, Nawabi H, Wang C, Tang S, Latremoliere A, Warren P, Schorle H, Uncu C, Woolf CJ, He Z, Steen JA (2015) Injury-induced decline of intrinsic regenerative ability revealed by quantitative proteomics. *Neuron* 86:1000-1014.
- Bray ER, Yungher BJ, Levay K, Ribeiro M, Dvoryanchikov G, Ayupe AC, Thakor K, Marks V, Randolph M, Danzi MC, Schmidt TM, Chaudhari N, Lemmon VP, Hattar S, Park KK (2019) Thrombospondin-1 mediates axon regeneration in retinal ganglion cells. *Neuron* 103:642-657.

- Duan X, Qiao M, Bei F, Kim JJ, He Z, Sanes JR (2015) Subtype-specific regeneration of retinal ganglion cells following axotomy: effects of osteopontin and mTOR signaling. *Neuron* 85:1244-1256.
- Fernandez DC, Chang YT, Hattar S, Chen SK (2016) Architecture of retinal projections to the central circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:6047-6052.
- He Z, Jin Y (2016) Intrinsic control of axon regeneration. *Neuron* 90:437-451.
- Li Y, He X, Kawaguchi R, Zhang Y, Wang Q, Monavarfeshani A, Yang Z, Chen B, Shi Z, Meng H, Zhou S, Zhu J, Jacobi A, Swarup V, Popovich PG, Geschwind DH, He Z (2020) Microglia-organized scar-free spinal cord repair in neonatal mice. *Nature* 587:613-618.
- Norsworthy MW, Bei F, Kawaguchi R, Wang Q, Tran NM, Li Y, Brommer B, Zhang Y, Wang C, Sanes JR, Coppola G, He Z (2017) Sox11 expression promotes regeneration of some retinal ganglion cell types but kills others. *Neuron* 94:1112-1120.
- Sanes JR, Masland RH (2015) The types of retinal ganglion cells: current status and implications for neuronal classification. *Annu Rev Neurosci* 38:221-246.
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B (2012) Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74:691-705.
- Tran NM, Shekhar K, Whitney IE, Jacobi A, Benhar I, Hong G, Yan W, Adiconis X, Arnold ME, Lee JM, Levin JZ, Lin D, Wang C, Lieber CM, Regev A, He Z, Sanes JR (2019) Single-cell profiles of retinal ganglion cells differing in resilience to injury reveal neuroprotective genes. *Neuron* 104:1039-1055.
- Wang J, He X, Meng H, Li Y, Dmitriev P, Tian F, Page JC, Lu QR, He Z (2020) Robust myelination of regenerated axons induced by combined manipulations of GPR17 and microglia. *Neuron* 108:876-886.
- Wang Z, Reynolds A, Kirry A, Nienhaus C, Blackmore MG (2015) Overexpression of Sox11 promotes corticospinal tract regeneration after spinal injury while interfering with functional recovery. *J Neurosci* 35:3139-3145.

P-Reviewers: Barnstable C, Oshitari T; C-Editors: Zhao M, Zhao LJ, Qiu Y; T-Editor: Jia Y

ANNEXE n°3

Axon guidance in regeneration of the mature central nervous system: step by step

Perspective publiée dans le journal Neural Regeneration Research

Mai 2023

Julia Schaeffer¹, Noemie Vilallongue¹, Stephane Belin²,
Homaira Nawabi²

¹ Les auteurs ont contribué de manière égale

² Lead contacts



Axon guidance in regeneration of the mature central nervous system: step by step

Julia Schaeffer[#], Noemie Vilallongue[#], Stephane Belin^{*}, Homaira Nawabi^{*}

Unlocking axon regeneration in the injured central nervous system: In adult mammals, central nervous system (CNS) neurons fail to regenerate after a lesion, whether it is traumatic – after spinal cord injury for example – or in the case of neurodegenerative diseases. This causes axons to degenerate and neurons to die, leading to permanent motor and/or cognitive impairment. One of the reasons behind this regeneration failure lies in the mature CNS environment, where a number of growth-inhibitory factors, at the lesion site, contributes to axon regrowth inhibition (He and Jin, 2016). In this context, removing such extrinsic factors should alleviate the growth-inhibitory barrier. Yet, surprisingly, no robust regeneration is achieved past the lesion site. These results led researchers to investigate the intrinsic regrowth properties of adult neurons themselves. Indeed, adult CNS neurons lose their capacity to grow an axon, not only because of the switch-off of developmental pro-growth programs during maturation, but also in response to the injury itself (Belin et al., 2015; He and Jin, 2016).

The mouse visual system is one of the best models to address the question of CNS regeneration. In the retina, only retinal ganglion cells (RGC) project their axons in the optic nerve and connect well-described brain nuclei to relay visual information. In 2008, mTOR pathway activation in RGC induced robust regeneration in the injured optic nerve, unlocking for the first time the regeneration capacity of adult CNS neurons (Park et al., 2008). This finding clearly demonstrated the importance of neuronal intrinsic contribution to axon regeneration. Since then, a number of pathways have been highlighted, and their activation, alone or in combination, has led to long-distance regeneration. For instance, upon optic nerve injury, the co-activation of mTOR, JAK/STAT, and c-myc pathways induces regeneration over 10 millimeters from the eye to the brain (Belin et al., 2015).

Thus, in the mature CNS, regenerating axons over long distances is not a roadblock anymore. However, one important gap remains: the lack of functional recovery. In particular, in all long-distance regeneration models, no or very little target reinnervation is observed, as regenerative axons are not able to reach properly their initial targets. Indeed, axons get lost on their way, with inappropriate orientations that are either undriven or in response to signals expressed in the adult environment.

Therefore, the field is now facing a new challenge: is there a possibility to guide regenerative axons in the mature CNS in order to reform a functional circuit after injury?

Step 1: Understand why regenerative axons get lost: Axon misguidance in regeneration has been observed for almost ten years. The development of whole-tissue clearing and 3D imaging approaches allowed to highlight such defects in the visual system. For example, Pernet and colleagues observed that, despite robust regenerative effect of Stat3 activation in RGC, axons fail to reach the distal part of the optic nerve, partly due to non-linear trajectories. In particular, regenerative axons exhibit abnormal branching – which is not observed in an intact optic nerve – and a high rate of looping and U-turns back to the eye (Pernet et al., 2013). Among these navigation defects, the most spectacular lie in the optic chiasm, a crucial choice point encountered by RGC axons

during development. In the mouse, 95% of RGC decussate in the optic chiasm to project to the contralateral optic tract, whereas the remaining 5% project ipsilaterally. In most long-distance regeneration models (Luo et al., 2013; Belin et al., 2015), many axons reach the chiasm, but get lost in this region, projecting aberrantly in the ventral hypothalamus outside of the optic tracts, or even in the contralateral optic nerve (Figure 1A).

Furthermore, even with sufficient growth distance, regenerative axons barely enter in the RGC primary brain targets, including the lateral geniculate nucleus or the superior colliculus. While a small number of studies detected regenerative fibers in the brain targets with partial functional recovery (Lim et al., 2016), this effect is absent in many others (Luo et al., 2013). Instead, these models collectively suffer from striking misguided trajectories that impact successful reinnervation and functional reconnection.

Altogether, the apparent random trajectories taken by regenerative axons may result from their incapacity to sense the environment – due to lack of sensors, e.g. a functional growth cone and/or the expression of appropriate receptors – or rather a capacity to integrate new signaling expressed in the mature CNS.

Step 2: Resume the initial circuit set-up during development: Axon guidance is the developmental process by which growing axons respond to external stimuli (chemical, mechanical) to reach, in a stereotypical manner, their end targets. Axon guidance mechanisms were first proposed by Ramon y Cajal in the early 20th century. The identity of guidance factors has been uncovered since the mid-90s (Stoeckli, 2018). Their description includes their mode of action – repulsive, attractive, contact, short-distance, long-distance – and the molecular mechanisms underlying the conformational change of the growth cone – receptor cleavage or endocytosis, local translation of effectors or cytoskeleton reorganization (Stoeckli, 2018). Moreover, multiple additional mechanisms have been highlighted to finely control neuronal circuit formation, including crosstalk between guidance factors and associated factors, mechanical stiffness of the environment, or the regulation of guidepost cells. Most studies focused on CNS structures where growing neurons make a binary decision: for example, to cross or not to cross the midline at the optic chiasm in the developing visual system (Figure 1B).

Despite this extensive characterization during development, the pattern of guidance cues expression remains elusive in the mature CNS (Craig and Mason, 2016). Indeed, axon guidance is considered of no use in a mature system, when circuits are formed and stabilized. In the injured CNS, many studies have characterized the expression of canonical guidance cues peripheral to the lesion site, which mostly exhibit a growth-inhibitory activity detrimental to regeneration. However, the expression of guidance factors across the path and in targets of regenerative axons is poorly described, and its correlation with misguidance defects is completely unknown. Recent work from our lab proposes such a map based on extensive proteomic characterization of the primary RGC targets in the brain (suprachiasmatic nucleus, ventral and dorsal lateral geniculate nucleus, superior colliculus) and of the critical choice point that is the optic chiasm, where many guidance defects

are reported (Vilallongue et al., 2022). Our study highlights a number of canonical guidance ligands and receptors expressed in the different regions, as well as guidance-associated factors such as adhesion molecules and extracellular matrix molecules (ECM).

Late after injury (28 days post-bilateral optic nerve injury), these regions, distal to the optic nerve lesion site, undergo a modification in protein content, including an upregulation of inflammatory molecules, a downregulation of cytoskeletal components, and a remodeling of the ECM (Vilallongue et al., 2022). For example, complement components C1q expression is upregulated in the lateral geniculate nuclei, which may be a consequence of RGC axon degeneration (including glial activation and debris clearing). Conversely, structural components of the axon cytoskeleton are downregulated in these regions after injury (such as the microtubule-associated protein Tau), which correlates with altered axon integrity and function. The remodeling of the ECM observed in all regions is of particular relevance in the guidance map. Indeed, some components of the ECM, such as CSPG, are regulators of the activity of guidance cues themselves. Furthermore, the composition of the ECM directly influences the environmental stiffness, which in turn acts on the guidance path of growing axons (Franze, 2020).

These changes in protein content show that these brain regions integrate the optic nerve injury signals and respond to them. To some extent, they could contribute to the reinnervation failure of these nuclei. Interestingly, the expression of guidance factors is not regulated by axon injury in the target regions, nor in the optic chiasm. Indeed, these structures display dynamic regulation of guidance cues during development, in particular, at key time points of circuit formation: axon guidance at E16–18, synaptogenesis at P0 to P4, synapse refinement at P7–P10 and visually-evoked activity around P14, when the eyes open. These findings suggest that, during maturation, the brain shifts from a pro-innervating state to a refractory state, where it cannot be connected again (Vilallongue et al., 2022). This implies the existence of a tight temporal window that allows circuit connectivity.

Step 3: Define a therapeutic strategy: In our recent work, we demonstrated that inducing growth programs to promote long-distance regeneration is not limiting for guidance. Indeed, the co-activation of the mTOR and the JAK/STAT pathways leads to long-distance regeneration of RGC up to the optic chiasm, but this manipulation does not affect their potential to respond to guidance cues expressed in their environment. We combined this regeneration model with the modulation of guidance molecules to reroute regenerative axons on their correct path (Vilallongue et al., 2022). As a proof-of-concept based on our newly described guidance map, we focused on two guidance cues expressed in the adult optic chiasm and known to be repulsive during development: Ephrin-B3 and Sema4D. We showed that regenerative axons express the corresponding canonical receptors. These cues elicit a repulsive response *ex vivo* when used in a stripe assay combined with mature retina explant cultures. Furthermore, *in vivo* modulation of these guidance signals controls axon pathfinding at the optic chiasm to resume the correct trajectory (Vilallongue et al., 2022; Figure 1C). Whether this modulation impacts RGC navigation further on the path remains to be determined, as well as how the ipsi- versus contralateral projections are segregated during regeneration.

These findings show that adult axon guidance is possible and relevant in a context of CNS regeneration. To rebuild a functional neuronal circuit, the upcoming challenge is to resume the initial trajectory for regenerating axons, while addressing an environment completely different from the embryonic one. Future therapeutic strategies will rely on a tight spatiotemporal control of the guidance signaling to allow regenerative axons to (i) grow on the right track,

(ii) enter the functional brain target, (iii) form synaptic connections with target neurons, and (iv) (re-)consolidate a functional circuit (Figure 1D). Importantly, these strategies should not interfere with the physiological roles of guidance cues in the mature brain, which are still not well characterized. For example, Eph/Ephrin signaling plays a role in the regulation and maintenance of synaptic activity (Henderson and Dalva, 2018). Therefore, modulation of this guidance signaling may have strong consequences on brain functions. How this type of guidance modulation may affect the capacity of regenerative axons to form and maintain functional synapses remains to be determined. In this context, a transient modulation of such signaling should be considered to avoid such alterations.

Another question that arises is the differential capacity and necessity of the many RGC subpopulations to respond to guidance molecules. With the ever more detailed description of these subpopulations, it is possible that the response to a given guidance cue may differ. Notably, recent studies have described extensively the differential injury response of various RGC subpopulations (Tran et al., 2019), in particular, in their capacity to survive and to regenerate. One feature that is currently uncharacterized is the guidance “identity card” of each RGC subpopulation, i.e. the actual guidance receptors and co-factors expressed in intact and injured conditions. Thus, one could take advantage of the specific RGC subpopulation-tagged mouse lines available to analyze their guidance potential in response to the relevant guidance cues. Indeed, as the topography of RGC projections in different brain nuclei is described in an intact circuit, guiding a specific subpopulation towards its appropriate target is even more

meaningful to rebuild the functional connection. In the same line, it is essential to determine whether the modulation of intrinsic growth properties affects the intrinsic mechanisms of segregation of ipsi- versus contralateral-projecting RGC.

Finally, the minimal number of regenerative axons necessary to resume a functional activity remains to be determined. As the system matures, the circuit plasticity decreases, and very little is known about how to refine/strengthen a circuit post-injury. In the case of long-distance regeneration, depending on appropriate guidance of regenerative axons to the correct target, synaptogenesis, and consolidation of the circuit will have to be monitored and possibly unlocked to ensure functional recovery.

Conclusion: While axon guidance is extensively characterized during development, the application of its principles to the injured CNS proves to be highly relevant to unlock the next step of a successful regeneration. In the mature CNS, it is essential to decipher the guidance map to orient regenerative axons towards their appropriate target. Based on these molecular maps, follow-up strategies may focus on the modulation of a particular pair of ligand/receptor to achieve the reinnervation of a particular target region. Not only do axons need to physically enter the target, but they should also form functional synapses to sustain functional recovery. Finally, on top of determining which spatial cues to modulate to resume the correct path, the temporality for guidance modulation is a critical parameter to consider. Altogether, appropriate guidance in an adult system will rely on the opening of this spatiotemporal window of reinnervation necessary for functional reconnection after injury.

This work was supported by the French National Research Agency under the “Investissements d’avenir” program (ANR-17-EURE-0003) (to SB and HN). This work was also supported by ERC-St17-759089-DRIVE and NRJ Foundation to HN and ANR ANR-18-CE16-0007 to SB. JS is supported by a postdoctoral fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) SPF201909009106. NV is supported by a PhD extension fellowship from Fondation pour la recherche médicale (FRM) – Programme Fin de Thèse FDT202204014716.

Julia Schaeffer[#], Noemie Vilallongue[#], Stephane Belin^{*}, Homaira Nawabi[#]

Univ. Grenoble Alpes, Inserm, U1216, Grenoble Institut Neurosciences, Grenoble, France

[#]Both authors contributed equally to this work.

^{*}Correspondence to: Stephane Belin, PhD, stephane.belin@inserm.fr; Homaira Nawabi, PhD, homaira.nawabi@inserm.fr.

<https://orcid.org/0000-0001-7074-6885>

(Stephane Belin)

<https://orcid.org/0000-0003-3155-2783>

(Homaira Nawabi)

Date of submission: December 13, 2022

Date of decision: February 16, 2023

Date of acceptance: February 27, 2023

Date of web publication: April 10, 2023

<https://doi.org/10.4103/1673-5374.373663>

How to cite this article: Schaeffer J, Vilallongue N, Belin S, Nawabi H (2023) Axon guidance in regeneration of the mature central nervous system: step by step. *Neural Regen Res* 18(12):2665-2666.

Open access statement: This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons AttributionNonCommercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.

References

- Belin S, Nawabi H, Wang C, Tang S, Latremoliere A, Warren P, Schorle H, Uncu C, Woolf C, He Z, Steen J (2015) Injury-induced decline of intrinsic regenerative ability revealed by quantitative proteomics. *Neuron* 86:1000-1014.
- Crair MC, Mason CA (2016) Reconnecting eye to brain. *J Neurosci* 36:10707-10722.
- Franze K (2020) Integrating chemistry and mechanics: the forces driving axon growth. *Annu Rev Cell Dev Biol* 36:61-83.
- He Z, Jin Y (2016) Intrinsic control of axon regeneration. *Neuron* 90:437-451.
- Henderson N, Dalva MB (2018) EphBs and ephrin-Bs: trans-synaptic organizers of synapse development and function. *Mol Cell Neurosci* 91:108-121.
- Lim JH, Stafford BK, Nguyen PL, Lien BV, Wang C, Zukor K, He Z, Huberman AD (2016) Neural activity promotes long distance, target-specific regeneration of adult retinal axons. *Nat Neurosci* 19:1073-1084.
- Luo X, Salgueiro Y, Beckerman SR, Lemmon VP, Tsoulfas P, Park KK (2013) Three-dimensional evaluation of retinal ganglion cell axon regeneration and pathfinding in whole mouse tissue after injury. *Exp Neurol* 247:653-662.
- Park KK, Liu K, Hu Y, Smith PD, Wang C, Cai B, Xu B, Connolly L, Kramvis I, Sahin M, He Z (2008) Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway. *Science* 322:963-966.
- Pernet V, Joly S, Jordi N, Dalkara D, Guzik-Kornacka A, Flannery JG, Schwab ME (2013) Misguidance and modulation of axonal regeneration by Stat3 and Rho/ROCK signaling in the transparent optic nerve. *Cell Death Dis* 4:e734-734.
- Stoeckli ET (2018) Understanding axon guidance: are we nearly there yet? *Development* 145:dev151415.
- Tran NM, Shekhar K, Whitney IE, Jacobi A, Benhar I, Hong G, Yan W, Adiconis X, Arnold ME, Lee JM, Levin JZ, Lin D, Wang C, Lieber CM, Regev A, He Z, Sanes JR (2019) Single-cell profiles of retinal ganglion cells differing in resilience to injury reveal neuroprotective genes. *Neuron* 104:1039-1055.
- Vilallongue N, Schaeffer J, Hesse AM, Delpech C, Blot B, Paccard A, Plissonnier E, Excoffier B, Couté Y, Belin S, Nawabi H (2022) Guidance landscapes unveiled by quantitative proteomics to control reinnervation in adult visual system. *Nat Commun* 13:6040.

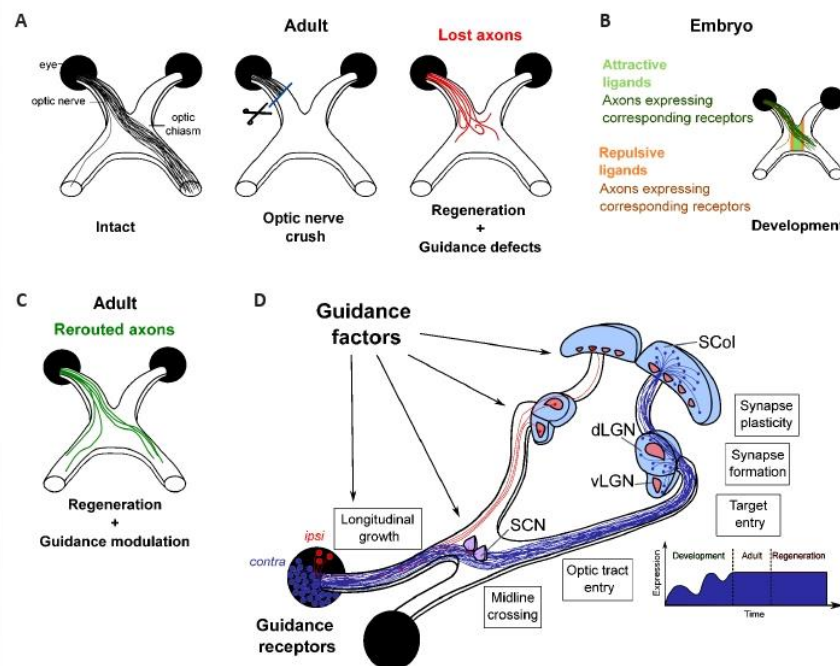


Figure 1 | Applying axon guidance principles towards a successful regeneration in the injured central nervous system.

(A) In the adult mouse visual system, 95% retinal ganglion cells normally project to the contralateral side, while 5% project ipsilaterally. In regeneration models, despite long-distance regrowth to the optic chiasm and beyond, regenerative axons fail to resume the correct trajectory, which prevents reinnervation of the initial targets and functional recovery. (B) During development, axons respond to guidance cues in the embryonic environment to extend towards their end targets. Notably, the optic chiasm is a crucial choice point where contra- and ipsi-laterally-projecting axons have to make the decision to cross or not to cross the midline. (C) Combination of guidance modulation and long-distance regeneration allows correct rerouting of regenerative axons on the initial pathway. (D) In regeneration models, guidance factors are integrated at multiple locations of regeneration path. Adult regenerative axons have the molecular tools to respond to guidance cues expressed along their path in the adult environment, in particular, to follow linear tracks and decide to cross or not to cross the midline at the optic chiasm. Guidance factors are also expressed in brain targets, and their expression remains stable upon injury, while during development, they undergo a dynamic regulation that correlates with target innervation and circuit formation. Finally, synapse formation and plasticity rely on expression and activity of guidance factors. dLGN: dorsolateral geniculate nucleus; SCN: suprachiasmatic nucleus; SCOL: superior colliculus; vLGN: ventrolateral geniculate nucleus. Created using Inkscape 0.92.3 drawing tool.

C-Editors: Zhao M, Liu WJ, Qiu Y, T-Editor: Jia Y