Université Pierre et Marie Curie

École doctorale n°158

- Cerveau Cognition Comportement -

Institut du Fer à Moulin, équipe « Développement cortical et pathologies »

Développement du cortex piriforme et de la commissure antérieure : implication de la protéine SCHIP-1

Par **Esther KLINGLER**

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par Laurence GOUTEBROZE

Présentée et soutenue publiquement le 26/09/2014

Devant un jury composé de

Dr Alain CHEDOTAL	Président du jury
Dr Fanny MANN	Rapporteur
Dr Catherine FAIVRE-SARRAILH	Rapporteur
Dr Ekaterini KORDELI	Examinateur
Dr Denis JABAUDON	Examinateur
Dr Alexander FLEISCHMANN	Examinateur
Dr Jean-Antoine GIRAULT	Examinateur
Dr Laurence GOUTEBROZE	Directeur de thèse

Thèse réalisée à l'Institut du Fer à Moulin,

INSERM/UPMC UMR-S 839

17, rue du Fer à Moulin - 75005 Paris

Sous la direction de Laurence Goutebroze

Dans l'équipe « Développement cortical et pathologies »,

dirigée par Laurence Goutebroze et Fiona Francis

Remerciements

Je remercie tout d'abord l'ensemble des *membres de mon jury* d'avoir évalué mes travaux. Merci à Fanny Mann et Catherine Faivre-Sarrailh d'avoir accepté la mission d'être rapporteurs de ma thèse, en vous souhaitant bonne lecture ! Merci à Alain Chédotal d'avoir accepté d'être président de mon jury, et merci de nous avoir montré les expériences de co-cultures, de m'avoir aidée pour mon projet et pour la rédaction de l'article, et de m'avoir toujours bien accueillie à l'institut de la Vision. Merci à Alexander Fleischmann pour les discussions sur le cortex piriforme.

Je remercie l'école doctorale *Cerveau Comportement Cognition* de m'avoir permis de réaliser cette thèse.

Je remercie Jean-Antoine Girault, directeur de l'institut du Fer à Moulin, de m'avoir accueillie au sein de cet institut, dont la qualité scientifique et l'ambiance de travail m'ont permis de passer 4 années formidables. Merci de m'avoir aidée pour tous les moments-clé de mon séjour ici, pour obtenir ma bourse de thèse puis le financement de la FRM, pour préparer mes entretiens de post-doc, et enfin merci de m'avoir aidée à la rédaction de l'article. Nos discussions ont toujours été enrichissantes pour moi, même si comme tu me l'as beaucoup répété, tu n'es pas un spécialiste du cône de croissance ! Enfin merci de nous avoir donné la possibilité d'organiser une journée des jeunes chercheurs à l'institut.

Je remercie très chaleureusement Laurence Goutebroze, ma directrice de thèse. Ces 4 années ont été pour moi très enrichissantes. Tu m'as toujours soutenue, tu m'as laissé une grande liberté tout en étant intéressée dès que j'avais de nouveaux résultats. Tu as toujours valorisé mon travail, ce qui m'a motivée tout au long de ma thèse. Tu m'as permis de gagner en confiance et en esprit d'initiative. Nos discussions m'ont beaucoup apporté et je trouve que nous avons plutôt bien réussi à travailler ensemble, de manière constructive (ce qui n'est pas forcément évident !). Merci de m'avoir permis de faire de l'enseignement et d'avoir une autre expérience que le labo. Merci de m'avoir encouragée à assister à divers congrès. Même si j'ai des fois pu douter ou être anxieuse concernant l'avenir, je sais que tu as tout fait pour m'aider et je t'en très suis reconnaissante.

Un immense merci à Julien Falk ! Je t'ai d'abord découvert via ton article sur la Séma3B et la commissure antérieure, puis à la fin de ma 1ère année de thèse, je t'ai « vraiment » rencontré à Marseille au club du Développement des Réseaux Neuronaux. Tu es venu voir mon poster, tu as fait des commentaires très constructifs et depuis, je ne t'ai plus lâché ! Merci de m'avoir appris à disséquer le cortex piriforme et à faire des co-cultures. Et surtout merci d'avoir toujours été là pour discuter de mon projet, de mes résultats et des expériences qu'il serait bon de réaliser. Si mon projet a réussi à décoller et si l'histoire est devenue plus cohérente, je pense que c'est en grande partie grâce à toi. Tu as toujours eu des remarques importantes, tu as toujours cru à mon projet et tu as réussi à me motiver dans les moments de découragement. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour ma thèse et pour mon « développement » scientifique !

- *Un grand merci à mon équipe, qui m'a soutenue, conseillée et motivée* –

Merci Marta, de m'avoir accompagnée dans mes premiers pas à l'IFM et de m'avoir intégrée si rapidement dans la bande des « fêtards » de l'institut ! Merci de m'avoir initiée aux cultures

cellulaires : je me rappellerai de nos expériences en duo en salle de culture, où nous arrivions à être hyper synchros et concentrées tout en nous amusant vraiment, même dans les moments plus galères ! Tu m'as transmis ta rigueur dans les manips et dans les analyses et tu m'as mise sur de bons rails pour continuer ma thèse. Merci d'avoir toujours été enjouée et motivée quand je te parlais de mes résultats et merci pour tous les conseils et astuces que tu as toujours su trouver pour me sortir du pétrin ! Merci pour ton aide à la fin de l'écriture du manuscrit. Enfin, merci pour ta bonne humeur et ton rire, pour nos pauses café, pour ton soutien. Sans toi, mes années à l'IFM n'auraient pas eu tant d'éclat !

Merci Fiona et Richard, pour toutes les discussions intéressantes et stimulantes que nous avons eues ces derniers mois et pour votre aide immense dans la correction de mon article. Je suis ravie que nous ayons rejoint l'équipe « Développement cortical et pathologies » !! Merci Marika, pour tous les bons moments passés ensemble depuis ton arrivée, merci pour le Yoga et pour l'Agora ! Merci aussi pour ton aide pour la partie statistique de mon article. Merci à mes voisines de bureau, Anne et Sylvie, toujours disponibles quand j'avais envie de discuter et en même temps discrètes quand j'étais concentrée, vous avez été des voisines idéales pour l'écriture ! Et enfin, merci Sara, Françoise, Mélissa et Gaël, de former une équipe si sympathique et de m'avoir soutenue pendant la rédaction!

- *Merci aux « habitants » du 4ème étage* -

Merci André, pour ton écoute et tes conseils. Je suis contente d'avoir été ta voisine à la fin de ma thèse et d'avoir eu de longues conversations avec toi sur divers sujets, notamment à propos de la langue française ! Merci de m'avoir aidée à préparer des présentations importantes, et d'avoir essayé de me faire prendre du recul face à mon projet, de voir les « choses en grand ». J'espère qu'un jour nous nous rencontrerons sur le Boul'Mich !!

Merci à Matthias, Corentin, Vera, Christiane et Thomas, des voisins forts sympathiques ! Corentin, merci d'avoir fait des manips d'électrophysiologie sur mes souris, même si le cortex piriforme n'est pas ta région préférée !

- *Des remerciements spéciaux pour …* -

Nicolas G., toujours disponible pour discuter, me conseiller et me soutenir. Merci de m'avoir aidée dans les premiers pas de la rédaction de mon article. Merci enfin pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble.

Patricia G., merci énormément pour ton aide et tes corrections pour la rédaction de mon article. Grâce à toi, j'ai essayé d'être moins « verbeuse » ! Merci pour toutes les discussions que nous avons eues et qui m'ont beaucoup apporté.

Alexandra R. & Xavier N., merci pour vos encouragements, vos conseils et toutes nos discussions sur le guidage des axones ! Je me souviendrai de notre séjour à Cold Spring Harbor !

Christine M., merci pour toutes nos discussions intéressantes, et merci pour un dîner fort sympathique à Marseille, en terrasse, avec Françoise, Lucie, Ahlem et Reham, lors du congrès de la société des Neurosciences françaises.

Mythili S., merci de m'avoir formée aux microscopes et vidéomicoscope. Merci pour ta gentillesse et ton attention. J'ai beaucoup aimé que tu sois toujours disponible pour m'aider et que tu me demandes toujours si mes expériences avaient fonctionné.

David Godefroy, merci pour les acquisitions au nanozoomer et pour nos expériences d'ultramicroscopie ! Et merci pour les bons moments passés à l'Institut de la Vision.

Rachida B., merci d'avoir pris soin de mes souris. Même si ça n'a pas toujours été facile, tu m'as énormément aidée pour gérer mes accouplements et grâce à toi j'ai pu faire les dernières expériences de ma thèse en mode intensif !

Dominique & Géraldine B., merci pour votre gentillesse et votre bonne humeur ! Vos rires sont un remède très efficace et nécessaire pour passer une bonne journée !

Merci Aude et Imane pour votre aide et votre gentillesse. Merci Emmanuel d'avoir été un bon « colocataire » de sorbonne en salle de culture et de m'avoir aidée avec Endnote ! Enfin, merci à Manuel, Eric, Anne, Sophie, Jocelyne et Chafia, par ordre croissant d'étage !

Merci à l'équipe du TP LV207 et particulièrement à Caroline Moreau et Tahar Rekab : j'ai beaucoup aimé enseigner dans cette matière, ce fut pour moi une expérience très enrichissante ! Caro, merci aussi de m'avoir initiée aux expériences d'hybridations *in situ* !

- *Un immense merci à tous les collègues devenus bien plus que ça …* -

Merci Quentin, pour tout ce qu'on a partagé, pour nos discussions, nos disputes, nos questionnements, merci d'avoir écrit le Journal Club sur le cortex piriforme avec moi, merci de m'avoir soutenue de manière inconditionnelle, et enfin merci pour nos soirées de danse effrénée au Merle Moqueur ! Je peux difficilement tout résumer, mais tu as été un réel pilier pour ma thèse. Merci Martin et Marion pour votre bonne humeur et toutes les pauses sympathiques qu'on a faites ensemble. Merci Ahlem pour toutes les discussions que nous avons eues, et pour ta compagnie en salle de culture et aux divers congrès ! Merci Frank, Salvatorre, Kris, Ferran, Serrena, Marie, Sebastian, Mariano, Cédric, Maria, Imane, Marta K, Sophie, Enrica, Assunta, Renata, François, Sarah, Lucile, pour tous les bons moments au labo, mais aussi ailleurs comme à des congrès pour certains et à la Ménagerie pour tous ! Ahlem, Frank et Quentin, merci d'avoir organisé avec moi la 1ère édition de la journée des jeunes chercheurs de l'IFM. François, merci d'avoir organisé le concours photos, même s'il tend à péricliter …

Merci aux copains de l'ED3C. Audrey, merci pour nos chinois du midi, merci d'avoir relu mon article même si tu ne connais rien au développement, et merci pour ton soutien. Merci aux habitants de l'ESPCI de nous avoir conviés aux jeudis-bières, et d'avoir permis que nous nous retrouvions régulièrement : merci Emna (avec un n) pour ta bonne humeur et toutes tes histoires géniales ; Isa, 3 moments-clé, une soirée dans un jardin insolite, une autre sur des rails abandonnés, et une après-midi au bord d'une piscine pas très remplie ! Enfin, Carole et Jean pour tous les bons moments !

- *… Sans oublier les ex-collègues, aussi devenus bien plus que ça !* -

Merci Lucie, pour ta bonne humeur, ton dynamisme et ta gentillesse. J'ai été très contente de partager le bureau avec toi quand je suis montée au 4ème. Merci de m'avoir transmis les trucs et astuces pour rédiger ma thèse, et merci d'avoir relu mon introduction. Enfin, merci pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble et toutes les discussions diverses et variées que nous avons eues. Nous n'oublierons pas nos journées salle-de-culture !

Merci Ingrid, Arnauld et Matthieu, les vieux de la vieille ! Vous vous souvenez du week-end à Saint Palais ? Le barbecue rose est toujours dans le bureau … ! Merci PO, pour nos bières chez Anis, nos Perudo et nos Caylus, et tous les bons moments qu'on a partagés. Merci Alfredo et

Cédric, pour votre bonne humeur et vos chansons qui égayaient le 2ème étage à une époque ! Merci Elodie pour les quelques discussions que nous avons eues et une soirée où nous avons bien dansé ! Enfin, merci Tanay, dont le séjour dans le bureau fut finalement très sympathique !

- *Un énoooooorme merci à tous les copains* -

Merci pour tous les bons moments en dehors du travail, qui permettent de rester motiver ! Ronand & Chach', Mathieu, Yannick, Léa, Hélène, Djé & Hélène (bis !), Nico & Lucie, Laydus, Charps, Martin, Evan, Valer, Guigui, Myrtille, Naomi, les grosses Céc', Fred & Faustine, Lucas, Guims, Anaïs, Boris, Raphaël E. Je me souviendrai en particulier de nombreux concerts et sessions de danses effrénées, d'un nouvel an alsacien et d'un séjour à Lisbonne ! Merci Jay-C, pour ton accueil à Roscoff et un festival au bout du monde sympathique. Merci Morgane, de m'avoir soutenue, conseillée et préparée pour divers moments importants de ma thèse. Grâce à toi, je n'oublierai plus de serrer les fesses lors de mes présentations !

Un grand merci à la famille De La Vega : merci pour votre accueil et les bons moments passés à Andernos-les-Bains ! Et merci tout spécialement à toi Camille, malgré la distance, on a réussi à rester connectées et c'est vraiment chouette de t'avoir comme amie ! Merci pour tous les bons moments, quand je suis venue à Hambourg puis Sylt, lors de tes retours à Paris, et de notre voyage à Budapest ! Evidemment, je ne peux pas tout dire, mais ton soutien m'a été très très précieux durant ces années. Petite dédicace spéciale aux étoiles, variées mais éclairées !

Enfin, merci à Sophie, qui me supporte depuis presque 25 ans ! Même si nos rencontres sont plus rares, ta compagnie est toujours agréable et réconfortante.

- *Merci à la smala, qui a été la bAse !* -

Merci merci merci à ma sister chérie Fanny! Toujours là pour un petit ciné, une soirée patates ou un gros fou rire (sauf quand tu gardes Elias !)… A l'écoute, tu as même essayé de t'intéresser à mon projet et de me donner des conseils quand j'étais bloquée ! Merci à mes parents, Hélène et Eric, pour … tout ! Merci Hélène pour nos lundis piscine-sauna détente et pour notre séjour « ski de fond dans le Vercors » ! Merci Eric de t'être intéressé à mon projet et aux Neurosciences en général, et évidemment merci pour tous les repas délicieux !

Merci à mes grands-parents, Moune et Georges, les chercheurs de la famille ! Merci Georges pour nos réflexions sur la recherche d'aujourd'hui. Merci Pierre, pour toutes les discussions et les bons moments lors de nos dîners oncle-nièce quand tu passais à Paris. Merci Marion, Christine et Robin. Merci à Danièle et Bernard de m'avoir accueillie à Lyon lors de mes déplacements « professionnels » et merci pour les bons moments à Corrençon ! Merci à Catherine et Dominique.

Merci à la « famille » plus éloignée, Laurence et François, Charlotte et Sandrine, merci pour nos dîners sympathiques et merci d'avoir tenté de vous intéresser à mon projet !

- *Last but not least* - Merci à Raphaël, pour son rôle immense dans cette œuvre ! La liste ne peut être exhaustive, mais merci pour ton soutien, ton écoute et ta patience. Merci pour nos apéros au Sympathique où nous avons parlé de mon projet quand j'étais bloquée, ou d'autres choses qui ont pu me contrarier durant ma thèse. Merci de m'avoir aidée et encouragée lors de mes « répétitions » pour diverses présentations. Merci pour nos voyages, Istambul, Corse, Saint-Pabu, Lisbonne, Séville, Rome, Cinque Terre, Bruxelles, New-York, Camargue, Venise … et évidemment merci pour tout le reste, qui me permet de voler sans plume au quotidien !

« La plus belle chose que nous puissions éprouver, c'est le mystère des choses. »

Albert Einstein

Table des matières

Table des matières 1

Figures 5

Tableaux 9

Préambule 11

Introduction 13

I. Le Cortex Piriforme 15

A. Organisation du système olfactif 15

1. De la cavité nasale au cortex olfactif 16
2. Organisation du cortex olfactif et évolution 19

B. Traitement de l'information au sein du cortex piriforme et olfaction 22

1. Représentation des odeurs et fonction du cortex piriforme 22
2. Contrôle de l'activité du cortex piriforme 24
3. Perception des odeurs et comportements associés 29

C. Développement du cortex piriforme 30

1. Migration des neurones et développement du cortex piriforme 30
2. Mise en place des connexions ipsilatérales du cortex piriforme 38

II. La commissure antérieure 43

A. Anatomie et rôle de la commissure antérieure 43

B. Développement précoce de la commissure antérieure 45

C. Croissance et guidage des axones 46

1. Cytosquelette du cône de croissance et protéines associées 49
2. Contrôle de la surface membranaire au cône de croissance 55
3. Adhésions cellulaires et contacts avec la matrice extracellulaire 56

4. Molécules de guidage axonal, récepteurs et co-récepteurs associés 61

D. Souris mutées et anomalies de la commissure antérieure 72

1. Protéines impliquées dans le développement de la commissure antérieure 72

2. Souris invalidées pour l'expression des sémaphorines de classe 3, de leurs récepteurs et co-récepteurs 72

3. Souris invalidées pour l'expression de l'ephrine B2, de EphB2 et EphA4 76

III. SCHIP-1, une protéine cytosolique d'interaction avec le cytosquelette cortical 87

A. SCHIP-1, un partenaire de la schwannomine/merline 87

1. La merline, une protéine de la superfamille 4.1 87

2. SCHIP-1, Schwannomine-Interacting-Protein 1 89

B. IQCJ-SCHIP-1 est concentrée au nœud de Ranvier et au segment initial de l'axone 91

1. Myélinisation et nœuds de Ranvier 91

2. Complexes moléculaires et organisation du nœud de Ranvier et du segment initial de l'axone 94

3. IQCJ-SCHIP-1 est recrutée tardivement au nœud de Ranvier et au segment initial de l'axone 104

4. SCHIP-1 interagit avec les protéines du cytosquelette cortical 105

C. Souris invalidées pour l'expression de SCHIP-1 109

1. Génération des souris *Schip1*Δ10 109

2. Les souris mutées *Schip1*Δ10 présentent des anomalies morphologiques des nœuds de Ranvier du SNP 111

Résultats 113

I. Article : SCHIP-1 est impliquée dans le guidage axonal et nécessaire au développement du cortex piriforme et de la commissure antérieure 115

II. Résultats non publiés 179

A. Données supplémentaires sur les rôles de SCHIP-1 dans la croissance, le guidage et la maturation des axones 181

1. Expression de la neuropiline 2 par les neurones du cortex piriforme et réponse à la sémaphorine 3F 181

2. Maturation axonale, localisation de NrCAM et formation du segment initial 182

B. Autres défauts de fibres observés dans le cerveau des souris *Schip1*Δ10 194

Discussion 197

I. Rôle de SCHIP-1 dans la croissance et le guidage des axones 199

II. Développement et organisation du cortex piriforme 206

III. Fonction de la commissure antérieure, du cortex piriforme et olfaction 208

IV. Défauts de substance blanche et pathologies 209

Annexes 213

I. Article 1 : SCHIP-1, un partenaire de l'ankyrine G, interagit avec la spectrine βIV et participe à l'organisation structurale des nœuds de Ranvier du système nerveux périphérique 215

II. Article 2 : Le CO2, stimulus trigéminal inodore, induit une réponse dans le cortex olfactif 257

Références bibliographiques 263

Figures

- Introduction -

Figure 1 | Le système olfactif chez la souris..... 15

Figure 2 | Des neurones sensoriels de l'épithélium olfactif au bulbe olfactif. 17

Figure 3 | Projections des cellules du bulbe olfactif vers le noyau olfactif antérieur *via* le tractus olfactif latéral. 17

Figure 4 | Organisation du cortex olfactif. 18

Figure 5 | Organisation du cortex piriforme en trois couches.. 20

Figure 6 | Organisation des régions corticales chez les Reptiles et les Mammifères.. 21

Figure 7 | Relations hypothétiques entre l'organisation en microcircuits des cortex à 3 couches et du néocortex à 6 couches..... 21

Figure 8 | De la cavité nasale au cortex piriforme.. 22

Figure 9 | Encodage spatial de l'information olfactive dans le cortex pirifome.. 24

Figure 10 | Réseau d'afférences et des fibres d'association du cortex piriforme. 26

Figure 11 | Modèle de représentation et d'apprentissage des odeurs dans le cortex piriforme..... 26

Figure 12 | Connexions inhibitrices dans le cortex piriforme.. 27

Figure 13 | Formation de la plaque corticale.. 31

Figure 14 | Origines des cellules convergeant vers le cortex olfactif dans la zone ventriculaire aux stades embryonnaires E10-E12. 32

Figure 15 | Vues détaillées des voies connues et hypothétiques de migration tangentielle dans le cerveau en développement..... 34

Figure 16 | Les cellules de la zone ventriculaire située à la frontière cortico-striatale migrent vers le cortex piriforme par la voie corticale latérale.. 35

Figure 17 | Expression de Dlx2 et Pax6 par les cellules empruntant la voie de migration corticale latérale au cours du développement. 36

Figure 18 | Comparaison de l'identité des cellules de la couche 2 du cortex piriforme nées précocemment et tardivement. 37

Figure 19 | Localisation du tractus olfactif latéral et des cellules « lot » nécessaires à sa formation, et distribution des cellules « lot » chez les souris mutées pour Gli3.. 37

Figure 20 | Mécanismes de guidage contrôlant la migration des cellules « lot » et position ectopique des cellules « lot » chez les embryons mutés pour la neuropiline 2 et la Séma3F. 39

Figure 21 | Molécules de guidage impliquées dans la formation du tractus latéral olfactif.. 40

Figure 22 | Défauts du tractus olfactif latéral chez les embryons mutés pour Slit1 et Slit2. 41

Figure 23 | Formation des branches collatérales des axones des cellules mitrales. 42

Figure 24 | La commissure antérieure. 43

Figure 25 | Les axones de la branche antérieure et de la branche postérieure de la commissure antérieure ne se mélangent pas. 44

Figure 26 | Les axones pionniers de la commissure antérieure à E13.5. 45

Figure 27 | Identification du cône de croissance.. 46

Figure 28 | Complexité et interactions des mécanismes à l'origine de la mobilité et du guidage du cône de croissance. 48

Figure 29 | Organisation du cytosquelette au cône de croissance.. 49

Figure 30 | Les filaments d'actine et les microtubules sont des polymères polarisés 50

Figure 31 | Domaines structuraux de la protéine bande 4.1 (érythrocyte) et des ERMs. 52

Figure 32 | Localisation et rôle des protéines ERMs au cône de croissance.. 54

Figure 33 | Modèle d'activation des protéines ERMs. 54

Figure 34 | Distribution des processus d'endocytose au cône de croissance. 56

Figure 35 | Interactions connues du domaine cytoplasmique des protéines L1CAM, neurofascine et NrCAM avec diverses protéines intracellulaires. 58

Figure 36 | Modèle de fonction du complexe L1CAM/ankyrine B/actine F dans l'initiation neuritique. 59

Figure 37 | Modèle de fonction du complexe L1CAM/ankyrine B/actine F dans la croissance neuritique. 59

Figure 38 | Trafic de la molécule d'adhésion L1CAM.. 60

Figure 39 | Régulation spatiale de l'endocytose et de l'exocytose dans le cône de croissance en migration. 63

Figure 40 | Schéma simplifié de la réponse aux sémaphorines de classe 3. 65

Figure 41 | Résumé de la régulation de la réponse à la Séma3A par l'endocytose. 66

Figure 42 | Schéma général des interactions entre les récepteurs Eph et les ephrines. 68

Figure 43 | Interaction ephrine B - EphB, répulsion, modèle de trans-endocytose. 69

Figure 44 | Voie de signalisation directe des Ephs..... 70

Figure 45 | Voie de signalisation inverse des ephrines B..... 71

Figure 46 | Anomalies de la commissure antérieure chez les souris mutées pour Npn2, Séma3F, NrCAM et Séma3B.. 74

Figure 47 | Anomalies de la commissure antérieure chez les souris mutées pour plexine A4 et Séma6A..... 75

Figure 48 | Expression des ephrines B, EphB2 et EphA4, et anomalies de la commissure antérieure chez les souris mutées..... 77

Figure 49 | Défauts de commissure antérieure décrits chez diverses souris mutées. 78

Figure 50 | Domaines structuraux de l'ezrine et de la merline. 88

Figure 51 | Les isoformes de *Schip1*..... 89

Figure 52 | SCHIP-1 interagit avec la merline..... 90

Figure 53 | Homologie de la région conservée de SCHIP-1 avec FEZ et UNC-76.. 91

Figure 54 | Les neurones sont des cellules polarisées.. 92

Figure 55 | Organisation de la gaine de myéline autour de l'axone dans le SNP.. 93

Figure 56 | Organisation du nœud de Ranvier..... 94

Figure 57 | Complexes moléculaires simplifiés au niveau des contacts axogliaux du nœud de Ranvier du SNP. 96

Figure 58 | Les canaux Na_v1 et KCNQ2/3 et leur motif d'interaction avec l'ankyrine G..... 98

Figure 59 | Organisation moléculaire simplifiée du segment initial de l'axone.. 99

Figure 60 | Modèle de développement des nœuds périphériques et du segment initial de l'axone.. 101

Figure 61 | Développement du segment initial de l'axone..... 103

Figure 62 | Localisation de IQCJ-SCHIP-1 au nœud et au segment initial de l'axone. 104

Figure 63 | L'enrichissement en IQCJ-SCHIP-1 des nœuds et du segment initial de l'axone apparaît après l'enrichissement en canaux Na_v et en ankyrine G.. 105

Figure 64 | Domaines structuraux des ankyrines B et G.. 106

Figure 65 | Domaines structuraux des spectrines et formation des tétramères..... 107

Figure 66 | Le domaine C-terminal de SCHIP-1 interagit avec le domaine MBD de l'ankyrine. 108

Figure 67 | Génération des souris *Schip1*Δ10. 110

Figure 68 | Proportions d'animaux par génotype au cours du développement. 111

Figure 69 | Anomalies morphologiques des nœuds du SNP chez les souris *Schip1*Δ10.. 112

- Résultats non publiés -

Figure 1 | Expression de la neuropiline 2 par les neurones de cortex piriforme en culture et croissance axonale.....185

Figure 2 | Rôle de SCHIP-1 dans la réponse à la sémaphorine 3F.....187

Figure 3 | Localisation de NrCAM et maturation axonale, immunomarquages sur cellules perméabilisées.....189

Figure 4 | Localisation de NrCAM et maturation axonale, immunomarquages sur cellules vivantes.191

Figure 5 | Formation du segment initial et rôle de SCHIP-1 dans la localisation de NrCAM.....192

Figure 6 | Les souris *Schip1*Δ10 présentent des défauts des fibres cortico-thalamiques et des fibres moussues.....195

- Discussion -

Figure 1 | Implication de SCHIP-1 dans les complexes protéiques au nœud de Ranvier et au cône de croissance. 201

Figure 2 | Modèle de dérégulation du développement axonal dans les troubles du spectre de l'autisme 211

Tableaux

- Introduction -

Tableau 1 | Voies de migration précoces (E10-E12) vers le cortex olfactif……33

Tableau 2 | Protéines impliquées dans le développement de la commissure antérieure et défauts de fibres décrits chez les souris mutées……79

Préambule

La protéine SCHIP-1 a été identifiée en tant que partenaire de la schwannomine/merline, une protéine de la superfamille 4.1 (Goutebroze et al., 2000). Initialement, les thématiques de l'équipe portaient sur les contacts axo-gliaux présents aux nœuds de Ranvier, structures spécialisées de l'axone enrichies en canaux sodiques dépendants du voltage permettant la conduction saltatoire du potentiel d'action. Dans ce cadre, Martin et collaborateurs ont montré qu'une isoforme de SCHIP-1 était concentrée tardivement aux nœuds de Ranvier et aux segments initiaux des axones matures. Cette localisation est dépendante du cytosquelette cortical d'ankyrine G et de spectrine βIV présent dans ces régions, avec lequel SCHIP-1 interagit directement (Martin et al., 2008 ; Martin et al., en préparation).

Afin d'appréhender la fonction de la protéine SCHIP-1, des souris mutées pour le gène *Schip1* ont été générées au laboratoire. Ces souris sont viables et fertiles. Elles présentent des défauts morphologiques du nœud de Ranvier. Cependant les protéines normalement concentrées au nœud de Ranvier sont présentes. La génération des souris mutantes, leur caractérisation et l'analyse des défauts du nœud de Ranvier constituent un article en préparation (Martin et al., en préparation), présenté dans le manuscrit en annexe (Article 1).

SCHIP-1 est fortement exprimée dans le cerveau dès les stades précoces de développement (stade embryonnaire E12). L'analyse du cerveau des souris mutées pour *Schip1* n'a pas montré d'anomalie remarquable dans l'organisation globale. Cependant, ces souris présentent des anomalies de substance blanche, dont un défaut extrêmement sévère au niveau de la commissure antérieure, un faisceau d'axones myélinisés du noyau olfactif antérieur, du cortex piriforme et de l'amygdale. Au cours de ma thèse, j'ai contribué à la caractérisation de ces souris. J'ai disséqué plus finement les défauts de la commissure antérieure et utilisé ces défauts comme modèle d'étude pour appréhender la fonction neuronale de SCHIP-1 au cours du développement.

Les embryons mutés présentent un retard de développement des axones de la commissure antérieure, qui n'atteignent pas la ligne médiane au stade où la commissure est normalement formée chez les embryons sauvages. Des expériences de culture cellulaire ont montré que SCHIP-1 participe à la croissance et au guidage des axones des neurones du cortex piriforme, une des principales structures dont les axones forment la commissure antérieure. SCHIP-1 joue notamment un rôle dans la réponse des cônes de croissance à la molécule de guidage répulsive EphB2, importante pour le développement de la commissure antérieure (Henkemeyer et al., 1996). Par ailleurs, les souris mutées pour *Schip1* présentent des anomalies morphologiques du

cortex piriforme, structure du cortex olfactif qui joue un rôle important dans la discrimination, l'association et l'apprentissage des odeurs (Bekkers and Suzuki, 2013).

L'ensemble des résultats acquis au cours de ma thèse est détaillé dans la partie « Résultats » du manuscrit, qui comprend mon article de thèse et des résultats non publiés.

Avant de détailler ces résultats, je présenterai en introduction le système olfactif, et plus spécifiquement le cortex piriforme et les processus développementaux nécessaires à sa mise en place. Je décrirai ensuite le développement de la commissure antérieure, en détaillant particulièrement les processus de guidage axonal impliqués. Je consacrerai enfin la dernière partie de mon introduction à la présentation de SCHIP-1, une protéine d'interaction avec le cytosquelette cortical de la cellule, dont une isoforme est concentrée aux nœuds de Ranvier et au segment initial de l'axone mature. Je finirai par la génération des souris mutées pour *Schip1* et décrirai brièvement les défauts observés aux nœuds de Ranvier chez ces souris.

- - -

INTRODUCTION

I. LE CORTEX PIRIFORME

A. Organisation du système olfactif

L'olfaction repose sur la **discrimination** et l'identification d'une odeur dans un environnement odorant donné. Les processus d'**association** vont permettre d'associer cette odeur à un contexte, un environnement ou une odeur apprise antérieurement, et sont de fait nécessaires à l'**apprentissage** de nouvelles odeurs. L'apprentissage repose également sur la plasticité neuronale, le stockage des informations et donc sur la mémoire.

Chez les Mammifères, la **perception des odeurs** a lieu grâce à l'activation des neurones sensoriels olfactifs situés dans l'épithélium olfactif de la cavité nasale, par des **molécules odorantes**. L'information odorante est relayée dans le cerveau par le bulbe olfactif, et transmise vers le **cortex olfactif** qui joue un rôle-clé dans des processus de discrimination, d'association et d'apprentissage des odeurs (Bekkers and Suzuki, 2013) (Figure 1). Chez beaucoup d'espèces de Mammifères, un autre système olfactif existe, le **système voméro-nasal**, spécialisé dans la perception des phéromones, en lien avec des comportements sociaux et reproductifs (Keverne, 1999). Dans ce système, l'information est relayée dans le cerveau par le bulbe olfactif accessoire, une structure anatomiquement distincte du bulbe olfactif (Figure 1).

Le cortex olfactif a donc la caractéristique d'être séparé du « monde extérieur » par seulement deux synapses. Les neurones du cortex olfactif projettent en retour vers le **bulbe olfactif** réalisant ainsi un rétrocontrôle (de Castro, 2009) (Figure 1). Le cortex olfactif projette également vers le **néocortex**, l'**hippocampe**, le **thalamus** et l'**hypothalamus** ; les fonctions de ces projections restent peu connues.

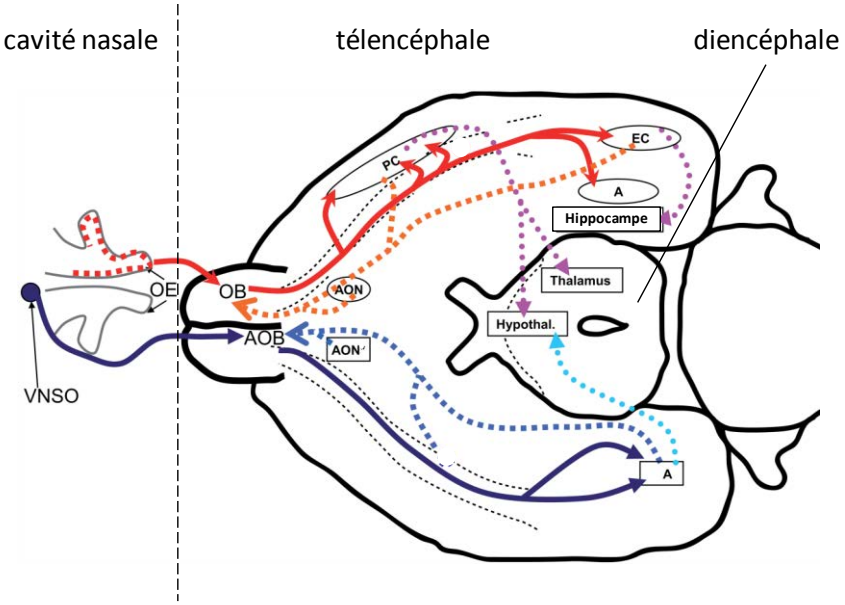


Figure 1 | Le système olfactif chez la souris, vue ventrale horizontale. Les neurones sensoriels de l'épithélium olfactif (OE, pointillés rouges) projettent dans le bulbe olfactif (OB). Les axones des

neurones du bulbe olfactif forment le tractus olfactif latéral (flèche rouge) qui projette dans le noyau olfactif antérieur (AON), le cortex piriforme (PC), le cortex entorhinal (EC) et l'amygdale (A). Les neurones sensoriels de l'organe voméronasal (VNSO) projettent dans le bulbe olfactif accessoire (AOB). Les neurones du bulbe olfactif accessoire projettent *via* le tractus olfactif latéral (flèche bleue) vers le noyau olfactif antérieur (AON) et l'amygdale (A). Les neurones du cortex olfactif projettent vers le bulbe olfactif (flèche orange pointillée) et vers le néocortex, l'hippocampe, le thalamus et l'hypothalamus (Hypothal., flèche violette pointillée). Les neurones du cortex olfactif accessoire projettent vers le bulbe olfactif accessoire (flèche bleue claire pointillée) et vers l'hypothalamus (flèche bleue turquoise pointillée) (Adapté de de Castro, 2009).

1. De la cavité nasale au cortex olfactif

Les **neurones sensoriels olfactifs** constituent le premier relai du système olfactif. Ils sont situés hors du cerveau, dans l'épithélium olfactif de la cavité nasale, et expriment des récepteurs aux molécules odorantes. Ces neurones sont des neurones bipolaires, possédant un prolongement court et un prolongement long. Le prolongement court est dirigé à travers la surface de la muqueuse nasale. Le prolongement long, non myélinisé, pénètre dans la *lamina propira* de l'épithélium olfactif accompagné de prolongements de cellules gliales spécialisées, et projette à travers la lame criblée, dans le cerveau, vers le **bulbe olfactif ipsilatéral** (De Carlos et al., 1996). L'ensemble de ces axones qui pénètrent dans le cerveau constitue le nerf olfactif. Les axones des **neurones sensoriels voméro-nasaux** forment le nerf voméronasal et projettent vers le **bulbe olfactif accessoire ipsilatéral**.

Le **bulbe olfactif** est une évagination du télencéphale. Au sein du bulbe olfactif, les axones des neurones sensoriels olfactifs vont initier des contacts synaptiques avec les dendrites apicales des **cellules mitrales et touffues**, formant ainsi les **glomérules** du bulbe olfactif (Woolf et al., 1991) (Figure 2). La structure en glomérules est également présente dans le bulbe olfactif accessoire même si elle est moins bien définie que dans le bulbe olfactif principal (Meisami and Bhatnagar, 1998). Le nez des rongeurs compte environ 5 millions de neurones sensoriels olfactifs qui expriment environ 1300 gènes codant pour des **récepteurs olfactifs** (Zhang and Firestein, 2002). Les neurones sensoriels olfactifs qui expriment le même récepteur olfactif sont distribués de manière aléatoire dans la cavité nasale, mais leurs axones convergent sur un même glomérule (Ressler et al., 1994; Mombaerts et al., 1996) (Figure 2).

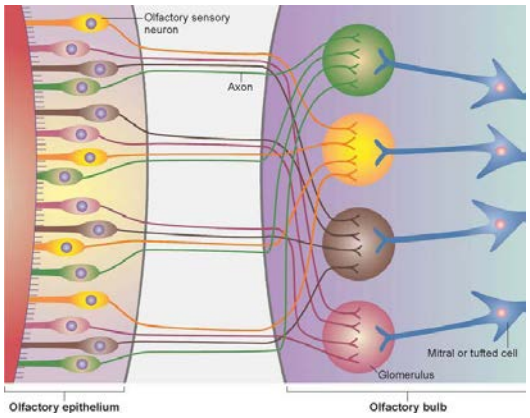
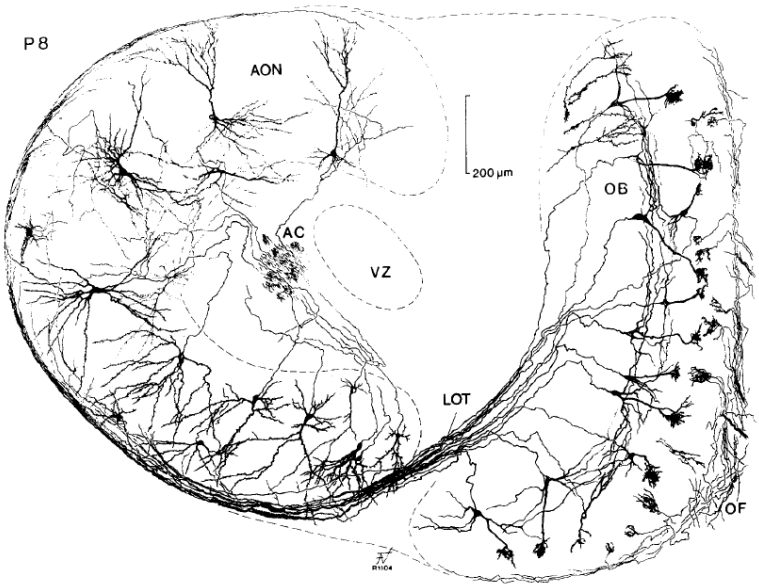


Figure 2 | Des neurones sensoriels de l'épithélium olfactif au bulbe olfactif. Un neurone sensoriel olfactif exprimant un type de récepteur olfactif projette sur un glomérule (glomerulus) spécifique au niveau du bulbe olfactif (mitral or tufted cell) (Mombaerts, 2006).

Les axones des **cellules mitrales et touffues** du bulbe olfactif projettent à leur tour à travers la partie caudo-latérale du bulbe olfactif en formant un faisceau de fibres, le **tractus olfactif latéral.** Le tractus olfactif latéral est localisé superficiellement le long du télencéphale basal et innerve le **cortex olfactif** (Figure 3). Les axones des cellules mitrales du bulbe olfactif accessoire projettent également vers le cortex olfactif *via* le tractus latéral olfactif mais ne se mélangent pas aux axones du bulbe olfactif principal : ils sont ségrégés dans la partie profonde du tractus (Inaki et al., 2004; Blanchart et al., 2006; Yamatani et al., 2004).



Abbreviations used in the figures

A	Amydaloid area	LV	Lateral ventricle
AC	Anterior commissure	OB	Olfactory bulb
Aq	Aqueduct (Silvius)	OF	Olfactory fibres layer
AON	Anterior olfactory nucleus	SP	Septal area
BT	Basal telencephalon	TV	Telencephalic vesicle
bta	Anterior basal telencephalon	VZ	Ventricular zone
e	Eye cup	4V	4th ventricle
H	Hippocampus	POC	primary olfactory cortex
LOT	Latral olfactory tract		

Figure 3 | Projections des cellules du bulbe olfactif vers le noyau olfactif antérieur *via* le tractus olfactif latéral. Dessin réalisé en caméra lucida à partir de 3 coupes consécutives de cerveau de

rat, marquées avec une coloration de Golgi à P8. Ici sont représentées les projections des axones du tractus olfactif latéral (LOT) dans le cortex olfactif au niveau du noyau olfactif antérieur (AON) (Lopez-Mascaraque et al., 1996).

Le **cortex olfactif** est une des trois principales structures du cortex cérébral des Mammifères, avec le néocortex et l'hippocampe. C'est un paléocortex situé dans la patie ventro-latérale du télencéphale chez la souris, composé de différentes structures, ici décrites selon l'axe antéro-postérieur du cerveau (Haberly, 2001; Brunjes et al., 2005) (Figure 4):

- le noyau olfactif antérieur,
- le tubercule olfactif localisé plus ventralement,
- le cortex piriforme,
- plusieurs noyaux amygdaloïdes,
- le cortex entorhinal, région la plus caudale du télencéphale ventro-latéral.

Les axones des cellules mitrales du bulbe olfactif projettent vers toutes les régions du cortex olfactif (Figure 4), alors que les axones des cellules mitrales du bulbe olfactif accessoire projettent vers le noyau olfactif antérieur et le complexe amygdaloïde spécifiquement. Le cortex olfactif ne reçoit aucune afférence sensorielle du thalamus, ce qui le différencie du néocortex.

Le **cortex piriforme** est la structure la plus étendue du cortex olfactif et la plus largement étudiée, notamment pour son rôle dans les processus de discrimination, d'association et d'apprentissage des odeurs. Il peut être divisé en deux régions, le cortex piriforme antérieur et le cortex piriforme postérieur. Le cortex piriforme antérieur reçoit plus d'afférences du bulbe olfactif que le cortex piriforme postérieur.

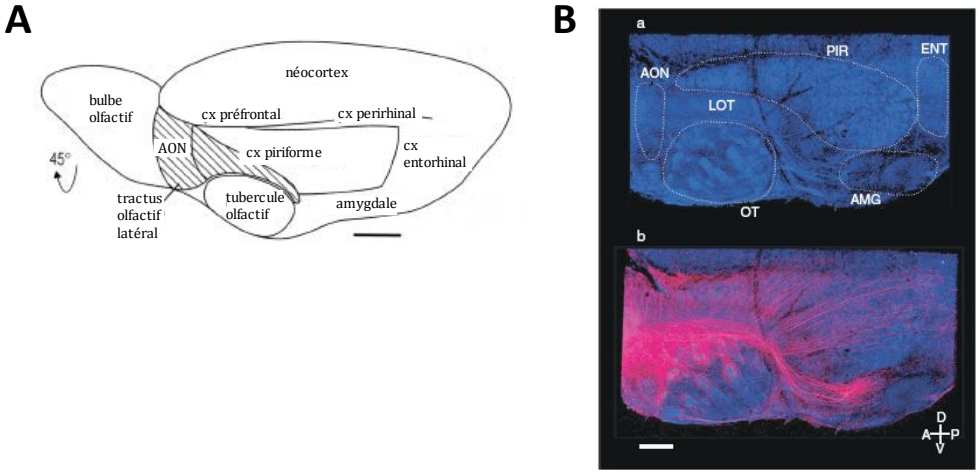


Figure 4 | Organisation du cortex olfactif. ***A***, Vue latérale d'un hémisphère du télencéphale de souris montrant les différentes structures du cortex olfactif. AON, noyau olfactif antérieur (Adapté de Shepherd, 2011). ***B***, Projections dans différentes aires du cortex olfactif des cellules mitrales et touffues d'un même glomérule. (***a***) Demi-cerveau contre-marqué (DAPI) et structures

du cortex olfactif délimitées en blanc. AMG, amygdale corticale ; ENT, cortex entorhinal latéral ; LOT, tractus olfactif latéral ; OT, tubercule olfactif ; PIR, cortex piriforme. (***b***) Demi-cerveau d'une souris dont un seul glomérule est électroporé avec le traceur antérograde dextran-TMR (rouge), permettant de visualiser les projections des axones. Barre d'échelle 700µm. (Sosulski et al., 2011).

2. Organisation du cortex olfactif et évolution

Le cortex cérébral peut être subdivisé en **couches**, définies par leur composition et leur densité en cellules, leurs afférences et leurs projections. **Contrairement au néocortex organisé en 6 couches, le cortex olfactif est organisé en 3 couches**, largement décrites au niveau du cortex piriforme, et définies de la manière suivante (Figure 5) :

- la **couche 1** est composée des terminaisons des axones des cellules mitrales et touffues du bulbe olfactif ipsilatéral (1a) et des terminaisons dendritiques des cellules pyramidales de la couche 2 (1b). Elle est appelée couche « fibrillaire ».
- la **couche 2**, très dense en corps cellulaires, est la couche des petites cellules pyramidales (glutamatergiques), ou cellules pyramidales superficielles (SP, pour *Spiny Pyramidal cells* ou *Superficial Pyramidal cells*) qui sont concentrées dans la partie profonde. D'autres cellules ont pu être identifiées d'après leur morphologie et leurs propriétés électrophysiologiques : les cellules pyramidales semilunaires (SL).
- la **couche 3**, beaucoup moins dense en corps cellulaires, est composée des cellules pyramidales de taille moyenne, ou cellules pyramidales profondes (DP, pour *Deep Pyramidal cells*).

Les interneurones (GABAergiques) peuplent toutes les couches du cortex piriforme et présentent les mêmes caractéristiques que ceux retrouvés dans le néocortex ou l'hippocampe. Plusieurs classes sont identifiables : les interneurones ciblant le soma, les interneurones ciblant les dendrites, et les interneurones ciblant l'axone (cellules de Chandelier).

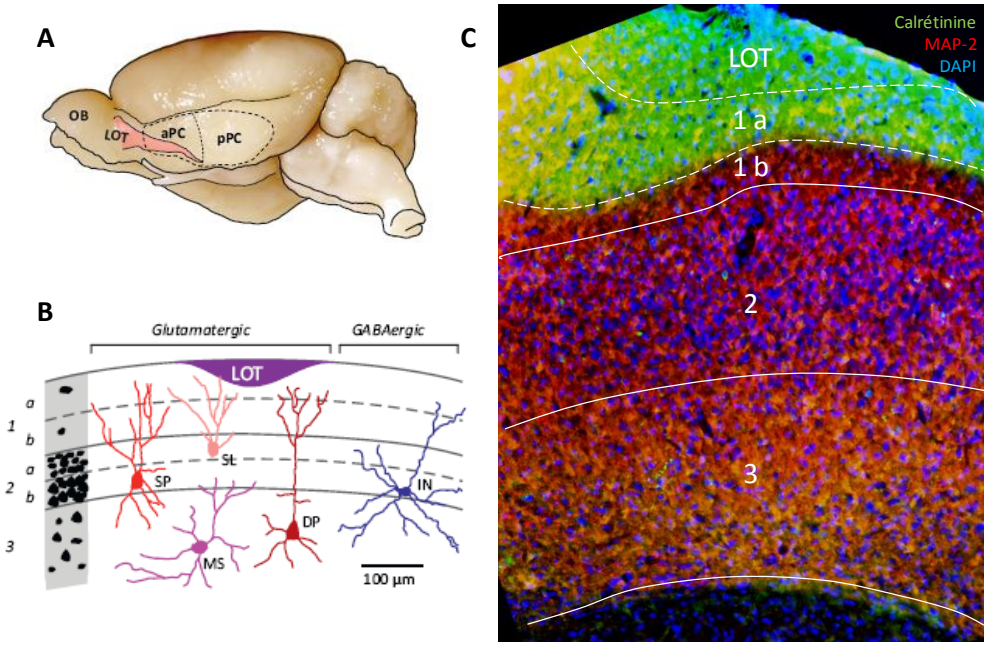


Figure 5 | Organisation du cortex piriforme en trois couches. ***A***, Partie ventro-latérale d'un cerveau de rat jeune, montrant l'emplacement du bulbe olfactif (OB) du tractus olfactif latéral (LOT), du cortex piriforme antérieur (aPC) et du cortex piriforme postérieur (pPC). ***B***, Cytoarchitecture schématique des types de neurones peuplant les couches du cortex piriforme. A gauche en noir, les densités relatives en corps cellulaires de chaque couche. Les cellules pyramidales semilunaires (SL) et superficielles (SP) ont leurs corps cellulaires concentrés dans les couches 2a et 2b respectivement. Les cellules pyramidales profondes (DP) et les cellules multipolaires (MS) sont concentrées dans la couche 3. Les interneurones (IN) peuplent les différentes couches (adapté de Bekkers and Suzuki, 2013). ***C***, Coupe coronale de cerveau adulte de souris au niveau du cortex piriforme antérieur, immunomarquée avec des anticorps anti-calrétinine révélant les axones des cellules mitrales du bulbe olfactif et anti-MAP-2 marquant les dendrites. Ces marquages permettent de délimiter les trois couches (lignes blanches) (image personnelle).

De nombreuses études suggèrent que le cortex olfactif est probablement la région du cortex cérébral la plus conservée au cours de l'**évolution**. En effet, il présente de fortes similarités avec le cortex cérébral des poissons, des amphibiens et des reptiles, organisé en 3 couches.

Chez les Reptiles, le télencéphale présente un petit cortex très fin et une région péri-ventriculaire très développée, appelée crête ventriculaire dorsale. Le cortex des Reptiles consiste en un cortex médial et un cortex dorso-médial comparables en termes de morphologie et de fonction à l'hippocampe des Mammifères, et en un cortex dorsal et un cortex latéral comparables au cortex olfactif des Mammifères (Aboitiz et al., 2002) (Figure 6).

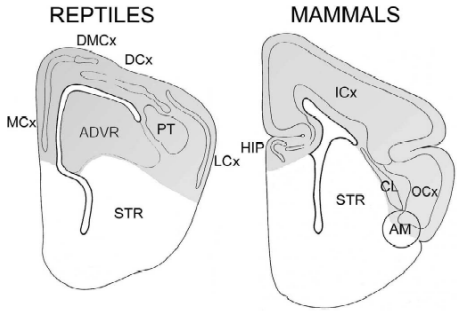


Figure 6 | Organisation des régions corticales chez les Reptiles et les Mammifères. Sections coronales d'un hémisphère cérébral de Reptile (à gauche) et de Mammifère (à droite) adultes. En gris sont représentées les différentes régions du pallium, en blanc les régions du subpallium. Les cortex médial (MCx) et dorso-médial (DMCx) des reptiles sont comparables à l'hippocampe (HIP) des Mammifères, les cortex dorsal (DCx) et latéral (LCx) au cortex olfactif (OCx). ADVR, crête ventriculaire antérieure dorsale ; AM, amygdale ; CL, claustrum ; ICx, isocortex ; PT, épaisseur palliale (présente seulement chez les tortues) ; STR, striatum (Aboitiz et al., 2002).

Des études ont été réalisées pour essayer de comprendre l'évolution d'un cortex à 3 couches vers un cortex à 6 couches, notamment l'étude de **microcircuits** (Figure 7). Un microcircuit est constitué de cellules pyramidales qui sont stimulées par des afférences primaires. L'activité de ces cellules pyramidales est régulée par les connexions horizontales d'association entre les cellules pyramidales (excitations récurrentes) et par un réseau inhibiteur d'interneurones. Ces microcircuits se retrouvent dans les cortex à 3 couches (cortex olfactif, hippocampe ou cortex des reptiles) et dans le néocortex à 6 couches, ce qui soutient l'hypothèse d'une origine évolutive commune (Shepherd, 2011). Le néocortex serait apparu au cours de l'évolution suite à la migration anormale de cellules au cours du développement du cortex, ce qui aurait conduit à l'apparition de nouvelles couches, une fois ces cellules intégrées dans les microcircuits.

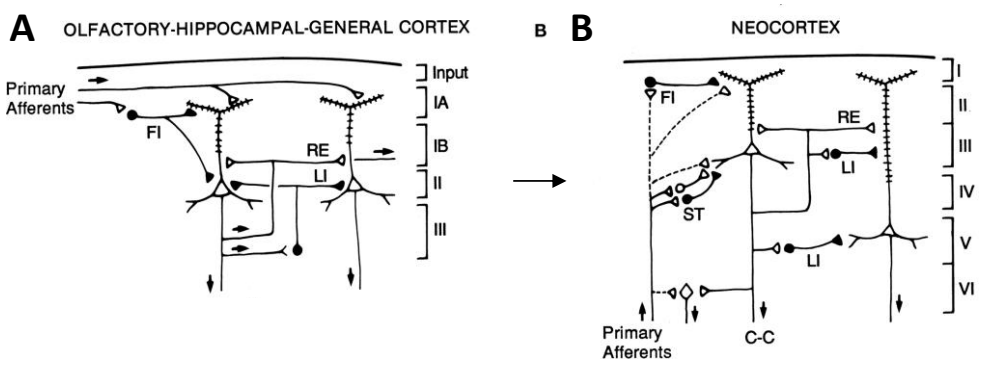


Figure 7 | Relations hypothétiques entre l'organisation en microcircuits des cortex à 3 couches et du néocortex à 6 couches. Les couches du cortex sont représentées à droite. Les flèches représentent la direction du flux d'activité. ***A***, Représentation simplifiée des microcircuits à 3 couches observés dans le cortex olfactif et l'hippocampe des Mammifères, et le cortex général (dorsal) des reptiles. Les synapses inhibitrices sont en noir, les synapses activatrices en blanc. Rétrocontrôle inhibiteur (FI), excitation récurrente (RE). ***B***, Microcircuits pour le néocortex. Fibres cortico-corticales (C-C), cellules étoilées (ST) (Shepherd, 1994).

B. Traitement de l'information au sein du cortex piriforme et olfaction

Le traitement de l'information odorante a lieu en deux « étapes » majeures : l'information odorante est d'abord encodée au sein des glomérules du bulbe olfactif, puis elle est transmise dans le cortex piriforme qui assure le traitement et l'intégration de l'information.

1. Représentation des odeurs et fonction du cortex piriforme

L'activation de différentes classes de récepteurs olfactifs sensoriels par des molécules odorantes est transformée au sein des glomérules du bulbe olfactif en une carte bien précise d'activations, la **carte odotopique**. La réponse des cellules mitrales et touffues du bulbe olfactif est contrôlée par un réseau local d'interneurones formé par des cellules granulaires, et par un rétrocontrôle négatif du cortex olfactif (Figure 8) (Barnes and Wilson, 2014). Le bulbe olfactif permettrait donc de **filtrer et de transformer l'information sensorielle** (Cleland, 2010).

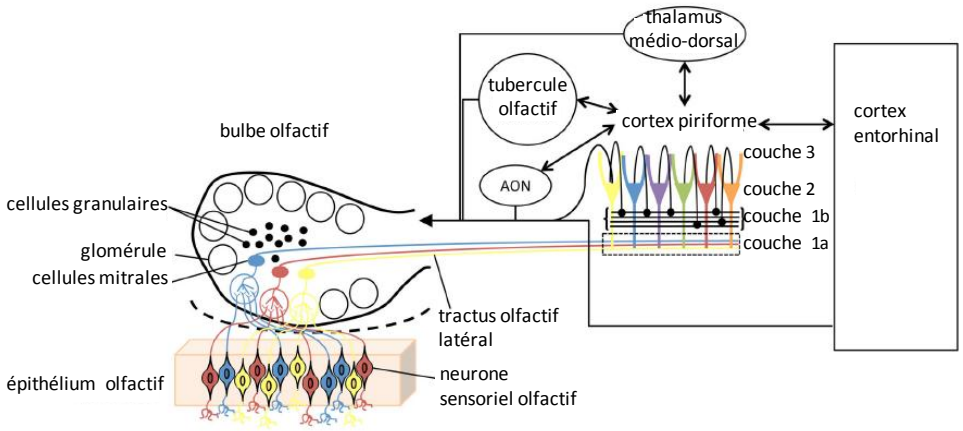


Figure 8 | De la cavité nasale au cortex piriforme. Les neurones sensoriels de l'épithélium olfactif exprimant différents récepteurs olfactifs ont des couleurs différentes. Les neurones sensoriels exprimant le même récepteur olfactif convergent sur un même glomérule dans le bulbe olfactif, où ils forment des contacts synaptiques avec les cellules mitrales et touffues. L'excitabilité des cellules mitrales est contrôlée par les cellules granulaires. Les axones des cellules mitrales et touffues forment le tractus olfactif latéral et projettent dans le cortex piriforme. Le cortex piriforme est connecté aux autres structures du système olfactif et exerce un rétrocontrôle sur le bulbe olfactif. Il présente également des connexions avec plusieurs aires limbiques (thalamus médio-dorsal) et corticales (cortex entorhinal) (Adapté de Barnes and Wilson, 2014).

L'organisation précise en carte odotopique dans le bulbe olfactif n'est pas retrouvée dans le cortex piriforme. Les cellules mitrales et touffues d'un même glomérule du bulbe olfactif projettent en effet de manière diffuse dans le cortex piriforme (Figure 9), **activant un patron unique, chevauchant et parsemé de neurones.** Ceci a été montré par des expériences d'imagerie calcique fonctionnelle : les neurones pyramidaux de la couche 2 du cortex piriforme

répondent de manière diffuse aux différentes molécules odorantes présentées à une souris anesthésiée (Miyamichi et al., 2011; Sosulski et al., 2011; Illig and Haberly, 2003) (Figure 9). L'encodage spatial de l'information codée par les bulbes olfactifs au niveau du cortex piriforme reste largement incompris à ce jour.

Les interneurones du cortex piriforme assurent des fonctions importantes dans le traitement de l'information : ils permettent d'augmenter la discrimination d'une odeur et empêchent des excitations non spécifiques. De fait, seuls 10% de neurones environ vont répondre à une odeur donnée (Rennaker et al., 2007; Poo and Isaacson, 2009; Zhang and Firestein, 2002; Zhan and Luo, 2010). Cette transformation permettrait au cortex piriforme de percevoir des mélanges complexes d'odeurs comme objet odorant distinct de ses composantes pures.

L'hypothèse actuelle concernant le rôle du cortex piriforme dans l'olfaction est la suivante : le cortex piriforme serait un **circuit de mémoire associative**, permettant de reconnaître les **caractéristiques moléculaires** d'une stimulation olfactive et de les transformer en représentations d'**odeurs holistiques** (Haberly and Bower, 1989; Wilson and Stevenson, 2003; Wilson and Sullivan, 2011). Les connexions apparemment aléatoires du bulbe olfactif au cortex piriforme suggèrent que les représentations d'odeurs dans le cortex piriforme sont apprises par l'**expérience**. Le cortex piriforme serait capable de détecter des odeurs en les comparant à une « librairie » d'odeurs qu'il aurait acquise précédemment (Wilson and Sullivan, 2011), et de construire des unités d'odeurs à partir des composés chimiques identifiés en amont dans le circuit olfactif (Johnson et al., 2000). En effet, le cortex piriforme peut être modélisé comme un outil de mémoire optimisé dans le stockage de représentations synaptiques d'odeurs (Barkai et al., 1994).

De manière intéressante, le cortex piriforme et l'hippocampe sont deux structures impliquées dans des mécanismes de **cartographie spatiale**. Le cortex piriforme permet la formation de cartes des odeurs à haute-résolution, alors que l'hippocampe permet la formation de cartes spatiales cognitives. Ces similarités suggèrent un mode de fonctionnement commun à ces deux structures.

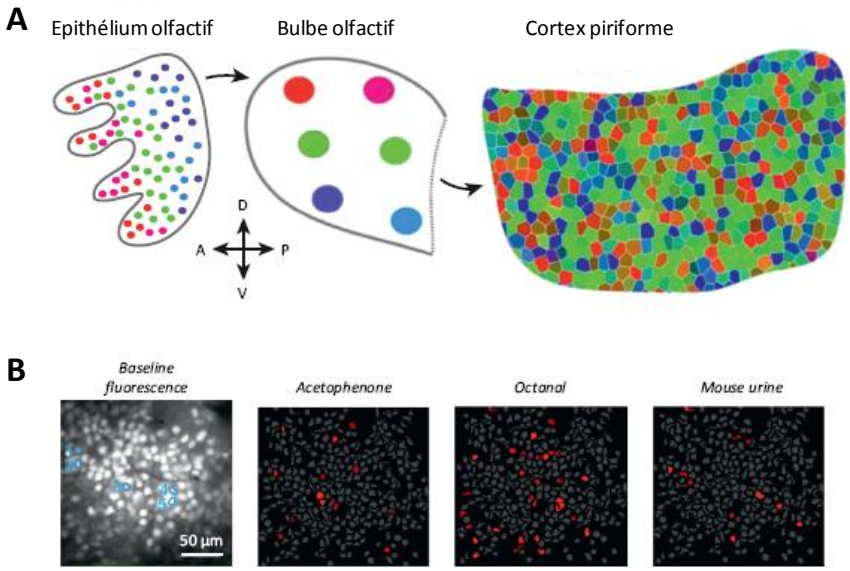


Figure 9 | Encodage spatial de l'information olfactive dans le cortex pirifome. ***A***, Résumé d'expériences de traceurs trans-synaptiques, confirmant les projections diffuses de bulbe olfactif (olfactory bulb) dans le cortex piriforme (piriform cortex). Cercles de même couleur dans l'épithélium olfactif (olfactory epithelium) : neurones sensoriels olfactifs exprimant un même récepteur olfactif. Cercles plus larges : les glomérules du bulbe olfactif. Les cellules activées par une même odeur (même couleur) sont organisées de manière aléatoire dans le cortex piriforme. ***B***, Imagerie calcique fonctionnelle : réponses des neurones de la couche 2 du cortex piriforme à des molécules odorantes chez la souris anesthésiée. A gauche, la fluorescence de base après injection de Oregon Green BAPTA-1 AM, visualisée en microscopie 2-photons. Les autres pannels sont localisés dans le même champ et montrent la réponse des neurones à différentes molécules odorantes (Adapté de Bekkers and Suzuki, 2013).

2. Contrôle de l'activité du cortex piriforme

a) Activation des cellules pyramidales du cortex piriforme

Les potentiels d'action générés par les axones des cellules mitrales et touffues des bulbes olfactifs sont émis en courtes bouffées, à une fréquence de ~10-200 Hz, modulée par la fréquence de la respiration (Cang and Isaacson, 2003). La synchronisation d'émission des potentiels d'action par les cellules mitrales dépend de la valeur de récompense d'une odeur et pas seulement de l'identité de l'odeur elle-même (Doucette et al., 2011). La stimulation des axones des cellules mitrales et touffues active directement les neurones pyramidaux semilunaires et superficiels de la couche 2 du cortex piriforme (Figure 10). Ces deux populations cellulaires ont des propriétés électrophysiologiques différentes et ont de fait des fonctions distinctes dans le traitement et l'intégration de l'information. L'activité des **cellules semilunaires** est directement liée à l'activité du bulbe olfactif. Ces cellules présentent en effet des courants post-synaptiques excitateurs (EPSCs) trois à quatre fois plus importants en moyenne que les cellules pyramidales superficielles, suite à une même stimulation par les axones du tractus olfactif latéral (Suzuki and Bekkers, 2011). De plus, elles présentent des

épines dendritiques concentrées dans les régions les plus distales des dendrites apicales, et sont donc morphologiquement adaptées pour les connexions avec les afférences du bulbe olfactif. Les **cellules pyramidales superficielles** présentent des dendrites basales qui s'étendent dans la couche 3. Leurs courants post-synaptiques excitateurs ont une composante associative plus élevée, ce qui montre que leur activité est davantage dépendante de rétrocontrôles locaux *via* des fibres d'association (Suzuki and Bekkers, 2011).

Les cellules pyramidales profondes de la **couche 3** reçoivent également des afférences du bulbe olfactif et de nombreuses afférences de fibres d'association, mais restent peu étudiées et forment probablement aussi une population hétérogène de neurones (Figure 10).

b) Contrôle de l'activité du cortex piriforme par les connexions d'association

Les **connexions d'association** sont très nombreuses au sein du cortex piriforme et sont retrouvées à différents niveaux. Au niveau local, des fibres récurrentes permettent les connexions entre cellules pyramidales voisines, dans une même région du cortex piriforme. Au niveau du cortex piriforme, les cellules pyramidales du cortex piriforme antérieur vont projeter sur les cellules pyramidales du cortex piriforme postérieur au sein de la couche 3, et inversement (Figure 10). Au niveau du cortex olfactif, des afférences d'association d'autres structures du cortex olfactif vont projeter sur les cellules pyramidales du cortex piriforme. Par exemple, des afférences du noyau olfactif antérieur projettent vers le cortex piriforme antérieur (Hagiwara et al., 2012) et des afférences de l'amygdale baso-latérale projettent vers le cortex piriforme postérieur (Luna and Morozov, 2012).

Ces connexions d'association se situent généralement à proximité du soma des cellules pyramidales, donc proches de la zone d'initiation des potentiels d'action. Elles sont très plastiques et très affectées par les neuro-modulateurs, comme l'acétylcholine ou la norépinephrine, le cortex piriforme recevant de nombreuses afférences cholinergiques et noradrénergiques (Hasselmo and Barkai, 1995; Franks and Isaacson, 2005). Il a été estimé que chaque cellule pyramidale du cortex piriforme reçoit au moins 2000 afférences d'association venant d'autres cellules pyramidales pour seulement 200 afférences venant du bulbe olfactif (Davison and Ehlers, 2011).

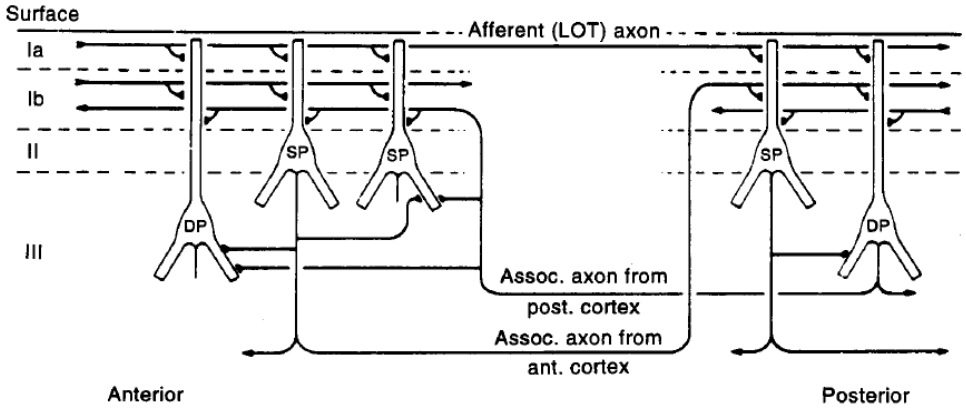


Figure 10 | Réseau d'afférences et des fibres d'association du cortex piriforme. Les afférences du bulbe olfactif terminent dans la couche 1a ; les afférences des autre régions olfactives terminent dans la partie superficielle de la couche 1b. Les fibres d'association reliant les cortex piriforme antérieur et postérieur sont localisées dans la couche 3 ; leurs terminaisons sont localisées dans cette couche ou projettent dans la partie profonde de la couche 1b. SP, cellules pyramidales superficielles ; DP, cellules pyramidales profondes ; LOT, tractus olfactif latéral (Haberly, 2001).

Les connexions d'association sont particulièrement importantes pour la fonction du cortex piriforme. La présentation d'une odeur active un patron unique de neurones dans le cortex piriforme. Giessel et Datta (2014) proposent un modèle de représentation des odeurs et de plasticité au sein du cortex piriforme : lors de la présentation d'un mélange de deux odeurs, l'activité de nouvelles synapses excitatrices et inhibitrices va conduire des cellules silencieuses lors de la présentation des deux odeurs séparemment, à émettre des potentiels d'action, et d'autres précedemment activées à devenir silencieuses (Figure 11). Ces processus de plasticité sont observés principalement pour les cellules pyramidales superficielles, présentant de nombreuses connexions d'association, et seraient cruciaux pour l'apprentissage de nouvelles odeurs (Giessel and Datta, 2014). L'acétylcholine favorise les processus de plasticité synaptique et stabiliserait la représentation d'un mélange d'odeurs comme objet odorant unique dans le cortex piriforme (Patil et al., 1998).

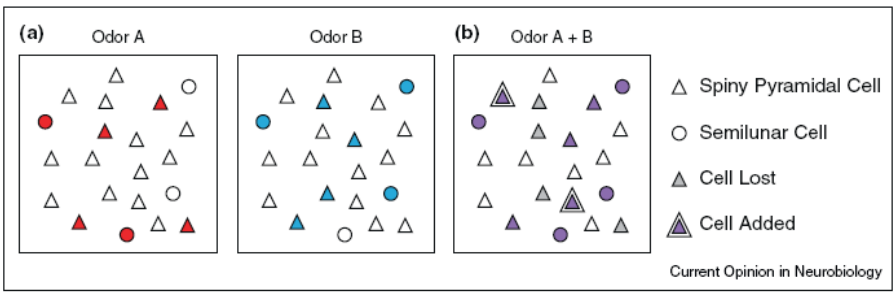


Figure 11 | Modèle de représentation et d'apprentissage des odeurs dans le cortex piriforme. (***a***) Représentation des odeurs dans le cortex piriforme. Les afférences du bulbe olfactif activent un patron unique, chevauchant et parsemé de neurones dans le cortex piriforme. Cellules semilunaires (cercles), cellules pyramidales superficielles (triangles). Des ensembles de cellules

activées (colorées) par deux odeurs différentes (A et B) sont représentés. (***b***) Présentation d'un mélange d'odeurs (A+B). Les cellules activées sont représentées en violet. Des cellules précedemment silencieuses émettent des potentiels d'action (triangles doubles), des cellules précedemment activées sont devenues silencieuses (centres gris). A noter : les cellules semilunaires restent activées alors que les cellules pyramidales épineuses sont ajoutées ou perdues dans la nouvelle représentation (Giessel and Datta, 2014).

c) Contrôle de l'activité du cortex piriforme par les interneurones

L'activité des cellules pyramidales du cortex piriforme est par ailleurs finement contrôlée par le réseau local d'**interneurones**, spécifiques des différentes couches. La couche 1 du cortex piriforme contient des interneurones horizontaux et de morphologie « neurogliale » qui ont des dendrites qui se ramifient dans la **couche 1a** du cortex piriforme et sont directement stimulés par les fibres du tractus latéral olfactif (Stokes and Isaacson, 2010; Suzuki and Bekkers, 2007); (Figure 12). Ces interneurones permettent de directement modérer et filtrer la stimulation des cellules pyramidales du cortex piriforme par le bulbe olfactif (Suzuki and Bekkers, 2010a, b). D'autres interneurones sont concentrés dans les **couches 2 et 3** du cortex piriforme, comme les petites ou les grandes cellules multipolaires à dendrites épineuses (MS, pour *Mutipolar cells with Spiny dendrites*) et les cellules « bi-touffues » (*bitufted*). Ces interneurones, appelés interneurones de rétrocontrôle, permettent de contrôler l'activité des cellules pyramidales des couches 2/3, mais leur rôle fonctionnel précis reste cependant à élucider.

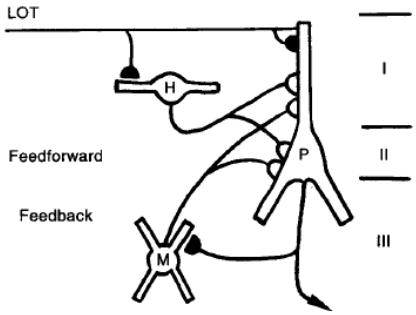


Figure 12 | Connexions inhibitrices dans le cortex piriforme. Une stimulation du tractus olfactif latéral (LOT) active les interneurones horizontaux (H) qui vont inhiber en retour les cellules pyramidales (P). Les cellules pyramidales activent les interneurones multipolaires (M) qui vont initier un rétrocontrôle négatif. Les synapses excitatrices sont représentées en noir, les synapses inhibitrices en blanc (Haberly, 2001).

Néanmoins, l'implication des interneurones des couches 2/3 semble particulièrement importante dans le contrôle de l'activité globale du cortex piriforme. Suite à une stimulation répétée des axones du tractus olfactif latéral, l'amplitude des courants post-synaptiques inhibiteurs de rétrocontrôle augmente dans le cortex piriforme (Stokes and Isaacson, 2010; Suzuki and Bekkers, 2010b). Cette augmentation est due à un recrutement progressif des cellules pyramidales semilunaires et superficielles au cours du train de stimulations, qui

entraine une augmentation du rétrocontrôle inhibiteur principalement assuré par les cellules multipolaires déchargeant rapidemment (MS, *fast-spiking*). Ces résultats suggèrent que dans ce cas, l'activité du cortex piriforme pourrait passer d'un contrôle par les afférences à un contrôle par les fibres d'association. Cette **balance excitation/inhibition** est particulièrement importante au niveau du cortex piriforme, structure très sensible aux **crises d'épilepsie**, chez l'Homme comme chez le rongeur (Gale, 1992; Loscher and Ebert, 1996).

d) Différences d'activité dans les régions antérieure et postérieure du cortex piriforme

Chez l'Homme comme chez les rongeurs, des différences existent dans le traitement des odeurs au sein des **cortex piriformes antérieur et postérieur** (Gottfried et al., 2006; Kadohisa and Wilson, 2006; Litaudon et al., 2003; Moriceau and Sullivan, 2004). Les axones du tractus olfactif latéral projettent en plus grand nombre dans le cortex piriforme antérieur que dans le cortex piriforme postérieur. Le cortex piriforme postérieur reçoit des afférences des cellules mitrales du bulbe olfactif mais leur contribution diminue en faveur des fibres d'association provenant du cortex piriforme et de structures corticales voisines, comme le cortex entorhinal. L'activité du cortex piriforme antérieur est, de fait, très influencée par l'activité du bulbe olfactif, alors que l'activité du cortex piriforme postérieur est plus corrélée avec celle du cortex entorhinal. De même, l'activité du cortex piriforme postérieur est beaucoup moins corrélée avec la respiration que l'activité du cortex piriforme antérieur (Litaudon et al., 2003). La nature des informations codées par ces deux régions du cortex piriforme serait également différente. Chez l'homme (Gottfried et al., 2002; Howard et al., 2009) et chez les rongeurs (Kadohisa and Wilson, 2006), le cortex piriforme antérieur coderait des informations en lien avec l'identité structurale de l'odeur (ex : odeur de banane). Les régions plus postérieures du cortex piriforme, peut-être en accord avec la dominance des fibres d'association, coderaient la catégorie perceptuelle de l'odeur (ex : odeur fruitée) (Howard et al., 2009; Gottfried, 2010). Le **cortex piriforme antérieur** serait donc plus relié au monde extérieur et impliqué dans la détection de **l'identité des odeurs** tandis que le **cortex piriforme postérieur** serait plus impliqué dans le codage introspectif de la **qualité des odeurs.**

3. Perception des odeurs et comportements associés

La perception des odeurs est nécessaire à certains comportements vitaux des Mammifères. En effet, l'olfaction est un sens essentiel pour la **nutrition** et les **comportements sociaux**, nécessaires à la survie de l'animal.

Dès le début de la vie, le cortex piriforme et ses afférences sont essentiels aux nouveau-nés pour leur survie, notamment pour l'attachement maternel et la nutrition. Des expériences d'association de l'odeur maternelle avec soit un comportement maternel normal, soit un comportement maternel maltraitant (mère stressée) chez le rat ont permis de montrer que l'odeur maternelle est apprise de manière associative au moment de la naissance, et fait intervenir en particulier le bulbe olfactif et le cortex piriforme antérieur mais pas l'amygdale (Roth and Sullivan, 2005). L'odeur maternelle va être associée aux soins maternels (stimulation tactile ou lait) et va permettre aux nouveau-nés de rester près de leur mère et de s'agripper à leurs mamelles pour se nourrir (Roth and Sullivan, 2005; Sullivan et al., 1990).

Par ailleurs, des comportements adaptatifs peuvent être liés de manière dynamique à l'activation d'ensembles de neurones du cortex piriforme (Choi et al., 2011). Grâce à des techniques d'optogénétique, les auteurs ont montré que l'activation par la lumière d'ensembles de cellules semilunaires et pyramidales superficielles de manière aléatoire peut être associée à des stimuli apétitifs ou aversifs, et ces associations peuvent être utilisées pour induire des comportements de préférence de place, par exemple.

C. Développement du cortex piriforme

1. Migration des neurones et développement du cortex piriforme

a) Vagues de migration précoces

Chez les Mammifères, le cortex olfactif commence à se mettre en place très tôt au cours du développement, comparativement au néocortex, en cohérence avec l'ordre de leur apparition au cours de l'évolution.

Les étapes de développement du néocortex ont été largement documentées. Chez l'embryon de souris, durant les 10 premiers jours de développement, le neuroépithélium pallial a un comportement prolifératif, permettant la génération de progéniteurs de manière exponentielle par divisions symétriques et conduisant à l'augmentation de la taille globale du télencéphale (Noctor et al., 2004). A partir du stade embryonnaire E11, les premiers neurones post-mitotiques du télencéphale sont produits grâce à des divisions asymétriques permettant de générer d'une part des progéniteurs qui restent dans la zone ventriculaire, et d'autre part des neuroblastes qui migrent radialement hors de la zone ventriculaire, c'est-à-dire vers la surface du télencéphale (Figure 13). Ces neurones s'accumulent de manière superficielle dans le neuroépithélium cortical pour former la **pré-plaque** juste en dessous de la couche de cellules de Cajal-Retzius (Marin-Padilla, 1971; Stewart and Pearlman, 1987; Narboux-Neme et al., 2008; Vitalis and Rossier, 2011) (Figure 13). Les cellules de Cajal-Retzius sont générées de manière précoce à la périphérie du pallium au stade embryonnaire E10 et migrent tangentiellement pour se positionner à la surface corticale (Bielle et al., 2005). Elles sécrètent des facteurs, comme la protéine de la matrice extracellulaire reeline, qui régule le positionnement des neurones corticaux dans l'épaisseur corticale (D'Arcangelo et al., 1995). La pré-plaque est une structure transitoire chez l'embryon de souris. Les axones des neurones qui la composent serviront d'axones pionniers pour l'établissement de divers faisceaux de fibres. A partir de E13, les vagues successives de nouveaux neurones excitateurs s'intercalent au milieu des neurones de la pré-plaque, la scindant en deux parties, une **zone marginale** à la surface et la **sous-plaque** près de la zone ventriculaire (Figure 13). De manière concomitante, la **glie radiaire** va se développer et atteindre la surface piale. Les prolongements de la glie radiaire permettent la migration des neuroblastes qui formeront la plaque corticale (Marin-Padilla, 1978; De Carlos and O'Leary, 1992) (Figure 13). Les neurones excitateurs des couches corticales sont générés successivement, des couches profondes aux couches superficielles (Figure 13).

Les interneurones sont générés dans les éminences ganglionnaires du sub-pallium (latérale et médiane), et migrent de manière **tangentielle**, donc parallèle à la surface du cerveau, pour envahir les couches du cortex à partir de E13 (Vitalis and Rossier, 2011).

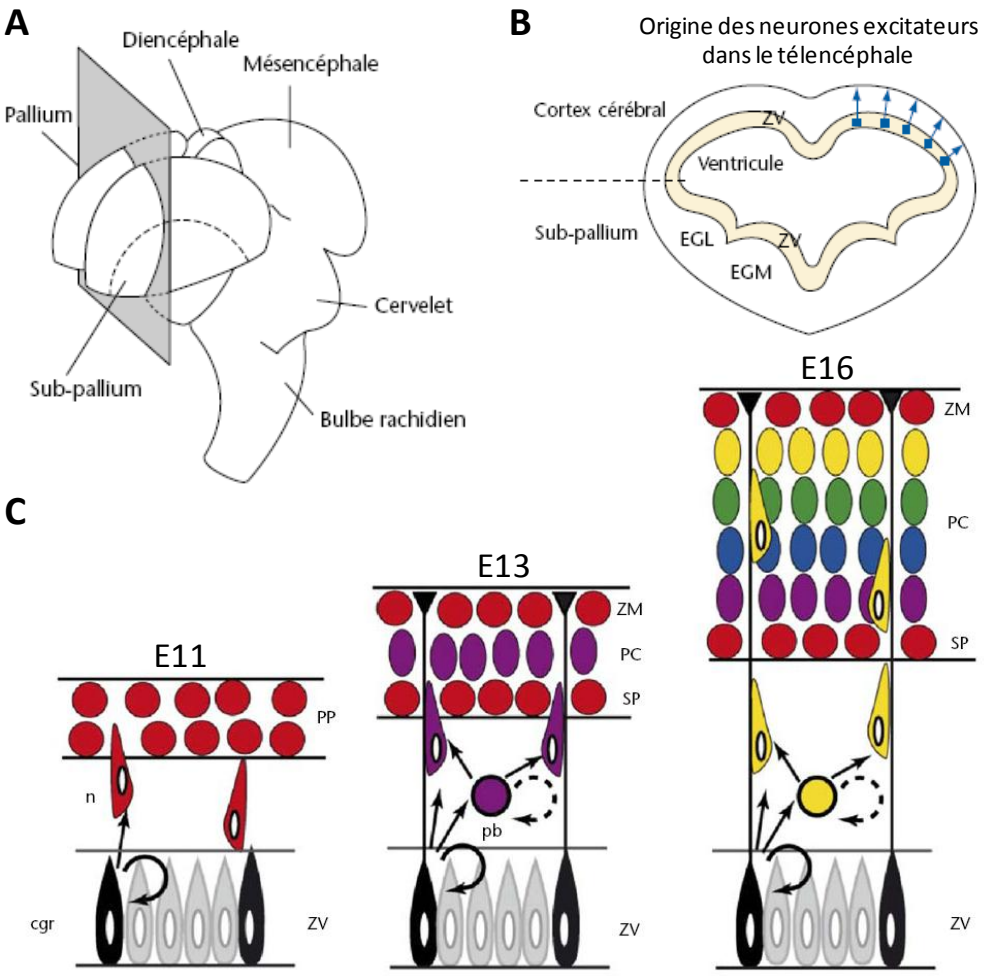


Figure 13 | Formation de la plaque corticale. ***A***, Schéma du cerveau embryonnaire. Les neurones du cortex cérébral ont deux origines, palliale et subpalliale, correspondant à deux compartiments du télencéphale. ***B***, Tous les neurones excitateurs sont générés localement dans la zone prolifération palliale (ZV, pour zone ventriculaire). ***C***, Schéma de génération des neurones excitateurs au cours de la corticogénèse. A E11, les cellules de la glie radiaire (cgr) de la zone ventriculaire (ZV) produisent les premiers neuroblastes (n) qui forment la pré-plaque (PP). Les neurones de la plaque corticale (PC) sont générés dans un second temps. Les neuroblastes des couches corticales migrent sur le support de la glie radiaire pour se positionner au milieu de la pré-plaque, qui est scindée en deux régions : la zone marginale en surface (ZM) et la sous-plaque (SP). Les neurones des couches corticales sont générés successivement, des couches profondes aux couches superficielles. Au lieu de produire un neuroblaste, les cgr peuvent générer un progéniteur basal (pb) capable de se diviser en au moins deux neuroblastes. EGL, éminence ganglionnaire latérale ; EGM, éminence ganglionnaire médiane (Adapté de Narboux-Nême and Gaspar, 2008).

Le développement du cortex olfactif commence quant à lui dès les stades embryonnaires E10-E12 par des **vagues de migration précoces,** venant de différentes régions de la zone ventriculaire, qui convergent vers le cortex olfactif (Garcia-Moreno et al., 2008) (Figure 14). Les cellules migrant de manière précoce vers le cortex olfactif sont générées dans la zone ventriculaire du sub-pallium, au niveau de l'éminence ganglionnaire latérale, du sulcus septo-éminentiel, mais aussi dans la zone ventriculaire du pallium, au niveau du télencéphale dorsal et du mur rostro-médial du télencéphale. Contrairement aux neuroblastes du néocortex qui suivent un mode de migration défini, les modes de migration, tangentiel ou radiaire, des neuroblastes du cortex olfactif varient selon la voie de migration, certaines populations de cellules pouvant adopter les deux modes de migration de manière séquentielle.

Grâce à des injections de traceur lipophilique DiI aux stades embryonnaires E10-E12 chez la souris, Garci-Moreno et collaborateurs ont pu reconstruire les cartes de migration ainsi que les régions de destination des cellules dans le cortex olfactif (Garcia-Moreno et al., 2008) (Tableau 1). La destination des cellules au sein du cortex olfactif varie selon leur origine. Les territoires du cortex olfactif envahis par les cellules ayant pour origine différentes régions de la zone ventriculaire sont distincts et ne se chevauchent pas. Ainsi, les cellules du cortex piriforme auraient pour origine la **partie dorsale de l'éminence ganglionnaire latérale**, la **partie caudale du télencéphale dorsal** et le **mur rostro-médial du télencéphale**. Le type cellulaire ainsi que la fonction de ces cellules selon leur origine ne sont pas élucidés.

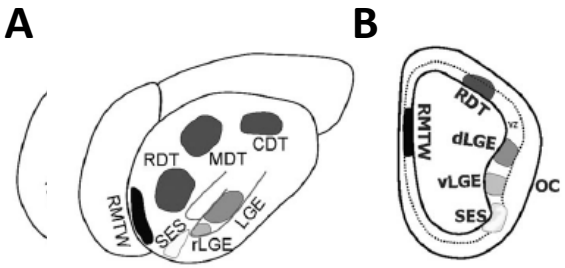


Figure 14 | Origines des cellules convergeant vers le cortex olfactif dans la zone ventriculaire aux stades embryonnaires E10-E12. ***A***, Schéma d'une vue latérale-dorsale d'un cerveau d'embryon de souris à E10-E12, avec les emplacements correspondant aux différentes zones de la zone ventriculaire. ***B***, Schéma de coupe coronale de cerveau d'embryon de souris à E10-E12, avec les différentes régions de la zone ventriculaire (vz). LGE, éminence ganglionnaire latérale (d) dorsale / (v) ventrale ; SES, sulcus septo-éminentiel ; RDT, télencéphale dorsal (R) rostral / (M) médial / (C) caudal ; RMTW, mur rostro-médial du télencéphale (Garcia-Moreno et al., 2008).

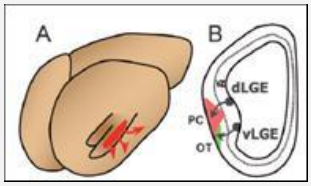
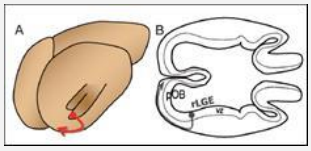
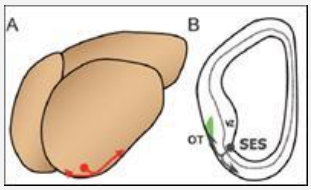
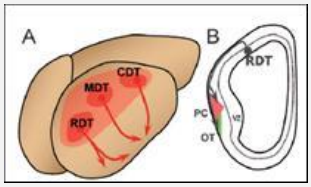
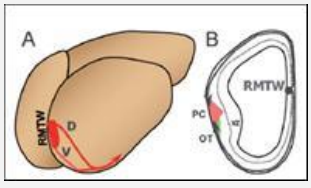
	origine dans la zone ventriculaire	type de migration	destination	identité cellulaire
	partie dorsale de l'éminence ganglionnaire latérale	migration radiale	cortex piriforme	Tbr1+ 74.1% Calrétinine+ 50% Reeline+ 23.5%
	partie ventrale de l'éminence ganglionnaire latérale	migration radiale	tubercule olfactif	Calbindine+ 11.3% Calrétinine+ 1.6% Tbr1+ 1.2%
	partie rostrale de l'éminence granglionnaire latérale	migration radiale jusqu'au cortex piriforme puis réorientation des cellules parallèlement à l'axe horizontal du cerveau et migration vers les régions rostrales	territoire présomptif du bulbe olfactif	Calrétinine+ 100% Tbr1+ 94.5%
	sulcus septo-éminentiel	migration radiale & migration tangentielle	territoire présomptif du bulbe olfactif tubercule olfactif (majorité des cellules)	Calbindine+ 54.5% Tbr1+ 15.5% Calrétinine+ 12.6% Reeline+ 7.1%
	télencéphale dorsal : - parties rostrale & médiane - partie caudale	migration tangentielle dans le neuroépithélium néocortical	tubercule olfactif cortex piriforme	Tbr1+ 92.7% Calrétinine+ 36.7% Reeline+ 18.8%
	mur rostro-médial du télencéphale	migrations tangentielles : - route dorso-latérale dans le néocortex - route ventro-médiane dans le mur médian	cortex piriforme tubercule olfactif	Calrétinine+ 50% Tbr1+ 10%

Tableau 1 | Voies de migration précoces (E10-E12) vers le cortex olfactif. Flèches rouges, voies de migration des cellules vers le cortex olfactif. LGE, éminence ganglionnaire latérale (d) dorsale / (v) ventrale / (r) rostrale ; SES, sulcus septo-éminentiel ; DT, télencéphale dorsal (R) rostral / (M) médial / (C) caudal ; RMTW, mur rostro-médial du télencéphale ; vz, zone ventriculaire ; pOB, territoire présemptif du bulbe olfactif ; PC, cortex piriforme ; OT, tubercule olfactif (Adapté de Garcia-Moreno et al., 2008).

b) La voie corticale latérale

Une autre voie de migration vers le cortex piriforme a été décrite, la **voie corticale latérale**. Cette voie de migration aurait lieu après les voies de migration précoces décrites précédemment. Elle constitue une route de migration tangentielle connue (Figure 15 *B*, **3**), au même titre que la voie de l'éminence ganglionnaire médiane au néocortex (Figure 15 *B*, **1**) et à l'hippocampe, la voie de l'éminence ganglionnaire médiane à l'éminence ganglionnaire latérale (Figure 15, **2**), et la voie de l'éminence ganglionnaire latérale au bulbe olfactif (Figure 15 *B*, **6**) (Corbin et al., 2001) (Figure 15).

Les neurones empruntant la voie corticale latérale sont générés dans la zone ventriculaire au niveau de la frontière cortico-striatale, entre le cortex et le striatum. Ces neurones migrent tangentiellement vers les régions ventrales latérales du télencéphale, puis radialement pour envahir le cortex piriforme. Contrairement aux autres voies de migration tangentielle connues dans le cadre de la migration des interneurones, les neuroblastes qui empruntent la voie corticale latérale se différencient principalement en neurones excitateurs dans le cortex piriforme.

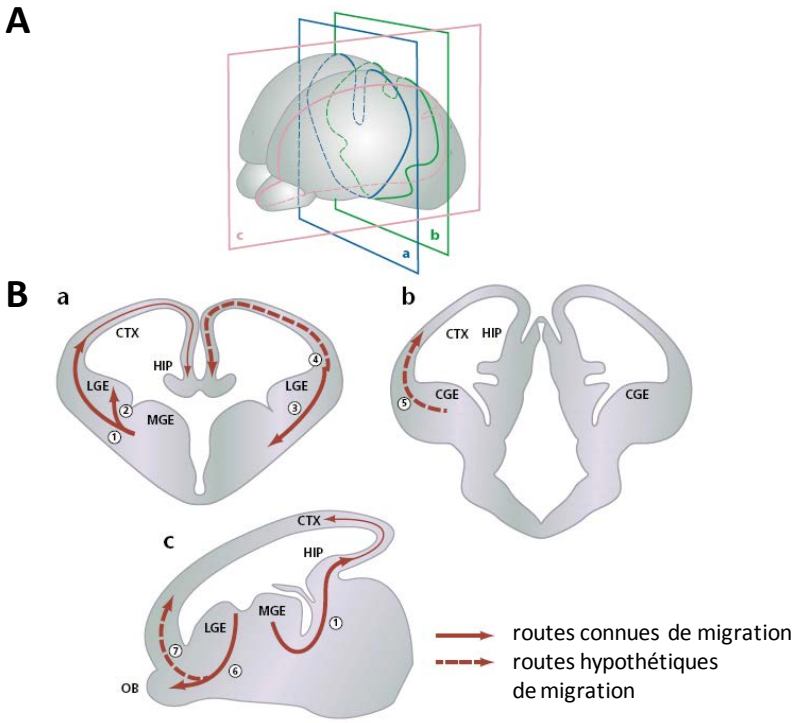


Figure 15 | Vues détaillées des voies connues et hypothétiques de migration tangentielle dans le cerveau en développement. ***A***, Représentation des coupes réalisées en ***B***. Le télencéphale embryonnaire est montré en coupe coronale rostrale **(*a*)**, en coupe coronale caudale **(*b*)** et en coupe sagittale **(*c*)**. ***B***, (1) voie de migration de l'éminence ganglionnaire médiane (MGE) au néocortex (CTX) et à l'hippocampe (HIP) ; (2) voie de migration de l'éminence ganglionnaire médiane à l'éminence ganglionnaire latérale (LGE) ; (3) voie corticale latérale ; (6) voie de l'éminence ganglionnaire latérale au bulbe olfactif (OB). Les voies de migration connues sont marquées par des flèches pleines, les voies hypothétiques par des flèches en pointillés. CGE, éminence ganglionnaire caudale (Adapté de Corbin et al., 2001).

La voie corticale latérale a été étudiée chez l'embryon de rat par Bai et collaborateurs (2008), grâce à l'électroporation à E13 d'un plasmide permettant l'expression de la protéine fluorescente mRFP par les cellules ayant été générées dans la zone ventriculaire à la frontière cortico-striatale (Figure 16). Ainsi, les auteurs ont pu suivre à différents stades de développement la migration de ces cellules. Après 3 jours, les cellules électroporées se sont dispersées et certaines envahissent la plaque corticale en migrant latéralement. Après 6 jours, les cellules électroporées qui ont migré plus loin sur l'axe de migration cortical latéral, atteignent un « réservoir » dans la partie la plus ventrale et envahissent le cortex piriforme. Les cellules ayant envahi le cortex piriforme se différencient en cellules pyramidales, positives pour le facteur de transcription Tbr1 (Bai et al., 2008).

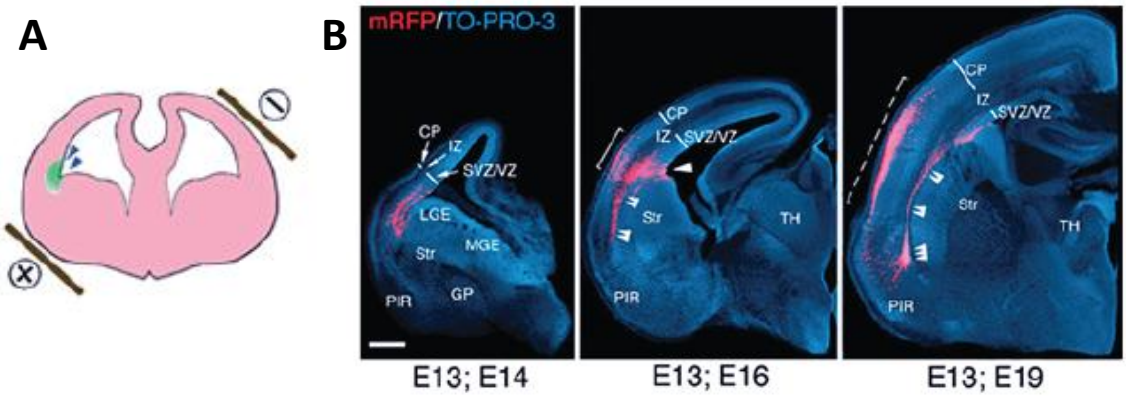


Figure 16 | Les cellules de la zone ventriculaire située à la frontière cortico-striatale migrent vers le cortex piriforme par la voie corticale latérale. ***A***, Schéma représentant la position des électrodes pour électroporer les cellules d'intérêt. ***B***, Position des cellules électroporées à E13 avec un plamide permettant l'expression de la mRFP un (E14), trois (E16) et six (E19) jours après électroporation. Après 3 jours, les cellules électroporées se sont dispersées : une sous-population envahit la plaque corticale (CP) en migrant latéralement. Après 6 jours, les cellules électroporées qui ont migré plus loin sur l'axe de migration cortical latéral (doubles têtes de flèche), atteignent un « réservoir » (triple têtes de flèche) dans la partie la plus ventrale et envahissent le cortex piriforme (PIR). VZ/SVZ, zones ventriculaire/sous-ventriculaire ; IZ, zone intermédiaire ; LGE, éminence ganglionnaire latérale ; MGE, éminence ganglionnaire médiane ; Str, striatum ; GP, globus pallidus ; TH, thalamus (Adapté de Bai et al., 2008).

Une autre étude réalisée chez la souris montre que l'identité des cellules qui migrent par la voie de migration corticale latérale n'est pas homogène et représente un mélange de progéniteurs neuronaux dérivés du pallium exprimant Pax6 (pour *paired box gene 6*) et du sub-pallium exprimant Dlx2 (pour *distal-less homeobox 2*) (Carney et al., 2006). Ces cellules migrent vers les régions du télencéphale basal, dans le cortex piriforme et l'amygdale. Ces deux populations de progéniteurs sont générées au cours de fenêtres temporelles précises et distinctes.

Dès E11.5, Pax6 est fortement exprimé dans les régions du pallium et de la frontière cortico-striatale au niveau de la zone ventriculaire. A ce stade, quelques cellules exprimant Pax6 sont visibles le long de la voie corticale latérale et dans le cortex piriforme (Figure 17). A E15.5, les cellules exprimant Pax6 ont envahi le cortex piriforme et le complexe amygdaloïde. Les cellules

exprimant Dlx2 émergent de la frontière cortico-striatale environ 2 jours après les cellules exprimant Pax6, à E13.5. A partir de E15.5, la migration des cellules exprimant Dlx2 est très importante et à E18.5, ces cellules s'accumulent dans le cortex piriforme et le complexe amygdaloïde (Figure 17). Une sous-population de cellules en migration co-exprime Pax6 et Dlx2. Les cellules positives pour Pax6 présentent un mode de **migration radiaire** le long de **glies radiaires**, identifiées de la frontière cortico-striatale dans la zone ventriculaire à la surface piale du télencéphale ventro-latéral à E13.5 et E15.5. Les cellules positives pour Dlx2 présentent quant à elles deux modes de migration distincts, certaines migrent de manière radiaire, mais d'autres présentent un mode de **migration « en chaîne »**, comme celui observé dans la voie de migration rostrale empruntée par les interneurones du bulbe olfactif. Les auteurs émettent l'hypothèse que ces cellules se différencieraient en **interneurones**, sachant que des cellules positives pour Dlx2 expriment la calbindine, un marqueur des interneurones, dans le cortex piriforme (Carney et al., 2006).

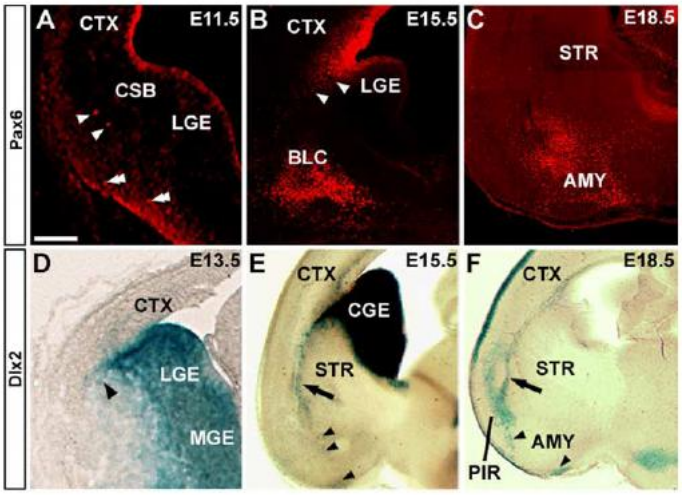


Figure 17 | Expression de Dlx2 et Pax6 par les cellules empruntant la voie de migration corticale latérale au cours du développement. La population Pax6 positive dérive du pallium, la population Dlx2 positive dérive du sub-pallium. A E11.5, Pax6 est fortement exprimée dans les régions du pallium et de la frontière cortico-striatale (CSB) au niveau de la zone ventriculaire. A ce stade quelques cellules pax6 positives sont visibles le long de la route putative de la voie de migration corticale latérale (flèches) et dans le cortex piriforme (double-flèches). A E15.5, les cellules positives pour Pax6 sont présentes le long de la voie de migration corticale latérale et dans le complexe baso-latéral de l'amygdale en développement (BLC). A partir de E18.5, de nombreuses cellules positives pour Pax6 positives sont dans les différents noyaux émergents de l'amygdale (AMY). A E13.5, les premières cellules positives pour Dlx2 émanent de la frontière cortico-striatale de la zone ventriculaire. A partir de E15.5, la migration de ces cellules est très importante (flèche) avec des cellules positives pour Dlx2 retrouvées dans l'amygdale en développement (complexe baso-latérale et noyaux corticaux) (têtes de flèche). A partir de E18.5, les cellules positives pour Dlx2 continuent de migrer le long de la voie corticale latérale (flèche) et s'accumulent dans le cortex piriforme (PIR) et le noyau cortical de l'amygdale (têtes de flêche). CTX, cortex ; LGE, éminence ganglionnaire latérale ; MGE, éminence ganglionnaire médiane ; STR, striatum (Carney et al., 2006).

c) Développement de la couche 2 du cortex piriforme

Une étude de Sarma et collaborateurs a permis de préciser la dynamique temporelle de génération des différents types cellulaires formant la couche 2 du cortex piriforme, dense en cellules pyramidales (Sarma et al., 2011) (Figure 18). Grâce à des injections de BrdU à différents stades de développement, les auteurs montrent que la plupart des **cellules pyramidales de la couche 2** sont générées à **E12** chez la souris. Les cellules générées à E14 sont moins nombreuses et deviennent également des neurones pyramidaux en majorité. Par contre, les cellules générées à E16 ont des identités plus variées : 43.25% de cellules deviennent des neurones pyramidaux (BrdU+ Tbr1+ NeuN+), 24.09% des cellules deviennent des neurones non-pyramidaux (BrdU+ Tbr1- NeuN+) et 32.66% des cellules ne sont pas des neurones (BrdU+ Tbr1- NeuN-).

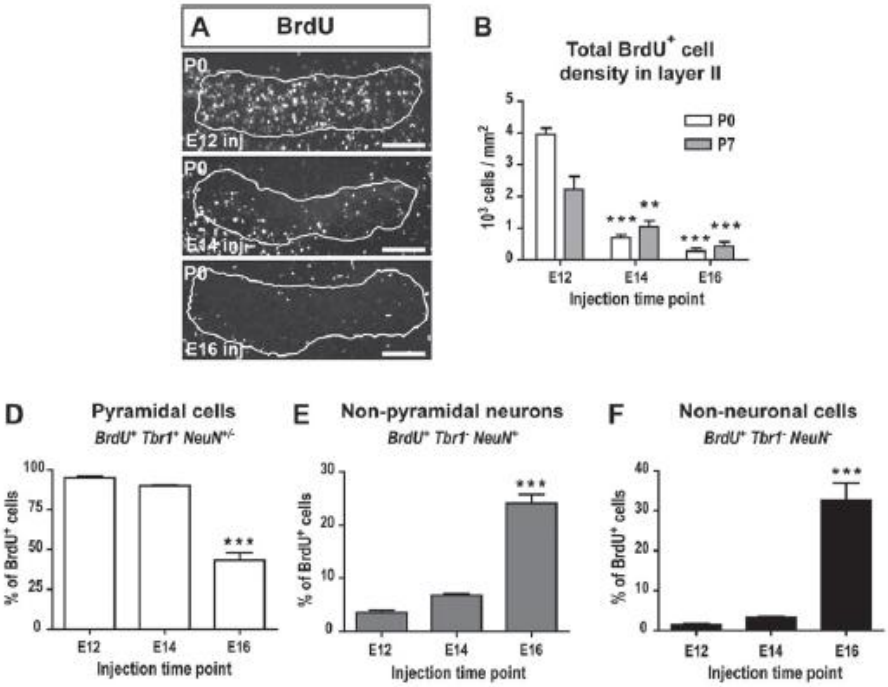


Figure 18 | Comparaison de l'identité des cellules de la couche 2 du cortex piriforme nées précocemment et tardivement. ***A***, Cellules de la couche 2 observées à P0 après injection de BrdU aux stades embryonnaires E12 (E12 inj), E14 (E14 inj) et E16 (E16 inj). ***B***, Densité de cellules positives au BrdU dans la couche 2 à P0 et P7 après injections aux différents stades embryonnaires. ***D-F***, Proportions de cellules pyramidales (*D*), non-pyramidales (*E*) et non-neuronales (*F*) BrdU positives dans la couche 2 à P7 après injections aux différents stades embryonnaires (Sarma et al., 2011).

2. Mise en place des connexions ipsilatérales du cortex piriforme

Nous avons précedemment décrit les connexions ipsilatérales retrouvées au sein du cortex piriforme. Le cortex piriforme reçoit des afférences du bulbe olfactif *via* le tracus olfactif latéral. Les neurones pyramidaux du cortex piriforme projettent sur le bulbe olfactif, le noyau olfactif antérieur, le cortex entorhinal et l'amygdale, et sur l'hypothalamus et le thalamus. Le développement des projections ipsilatérales du cortex piriforme reste largement inconnu à ce jour. Par contre, de nombreuses études se sont intéressées au développement des axones du tractus olfactif latéral.

Le **tractus olfactif latéral** apparaît chez l'embryon de souris entre E11.5 et E12. Il couvre la surface du cortex olfactif à partir de E13.5 et les branches collatérales se développent et envahissent le cortex olfactif à partir de E14.5. Sa formation repose sur des signaux intrinsèques aux neurones du bulbe olfactif, comme l'expression des facteurs de transcription Pax6 ou Lhx2 (Saha et al., 2007; Nomura and Osumi, 2004). Le développement du tractus olfactif latéral nécessite également la présence de cellules pionnières appelées **cellules « lot »** (pour *lateral olfactory tract*) qui vont migrer de manière précoce et s'organiser autour du territoire présomptif du tractus olfactif latéral, créant ainsi une « route » pour les axones des cellules mitrales et touffues.

Les cellules « lot » arrêtent de se diviser aux stades embryonnaires E9.5-E11 chez la souris et commencent à exprimer l'antigène lot1, aux stades E12-E12.5. A ces stades de développement, les cellules « lot » sont déjà organisées autour du territoire présomptif du tractus olfactif latéral. Elles sont générées dans la zone ventriculaire de tout le néocortex et migrent tangentiellement à la surface du néocortex et ventralement vers le territoire présomptif du tractus olfactif latéral. Une fois arrivées au niveau du territoire présomptif du tractus latéral olfactif, elles arrêtent leur migration ventrale et tangentielle, et migrent selon l'axe rostro-caudal pour s'assembler en amas de cellules (Tomioka et al., 2000) (Figure 19, *A*). Tomioka et collaborateurs montrent qu'une mutation dans le gène codant pour le facteur de transcription Gli3, exprimé par les précurseurs des cellules « lot » dans la zone ventriculaire, entraine une migration anormale des cellules « lot » qui sont distribuées partout dans le néocortex. Chez ces souris mutées, le tractus olfactif latéral ne se forme pas correctement (Figure 19, *B*). De plus, l'ablation des cellules « lot » par incubation avec de la 6-OHDA dans des cultures organotypiques empêche les axones du tractus olfactif latéral de pousser (Sato et al., 1998).

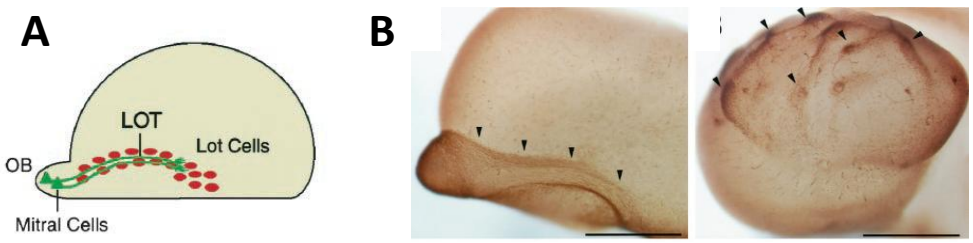


Figure 19 | Localisation du tractus olfactif latéral et des cellules « lot » nécessaires à sa formation, et distribution des cellules « lot » chez les souris mutées pour Gli3. ***A***,

Représentation latérale d'un hémisphère du télencéphale. Les axones des cellules mitrales (mitral cells) du bulbe olfactif (OB) forment le tractus olfactif latéral (LOT) (en vert). Les cellules « lot » (en rouge) sont localisées autour du tractus olfactif latéral. ***B***, Vues latérales du télencéphale d'embryons de souris à E14.5, marqué avec un anticorps anti-lot1. (A) Distribution normale des cellules « lot » autour du tractus olfactif latéral (têtes de flèches), (B) Distribution des cellules « lot » chez les embryons mutants pour Gli3 dans tout le néocortex (Adapté de Tomioka et al., 2000).

La **migration des cellules « lot »** repose sur l'expression de molécules connues pour leur rôle dans le guidage axonal. Le néocortex exprime des signaux en gradient dorso-ventral qui vont orienter les premières étapes de migration des cellules « lot ». Le télencéphale ventral émet des signaux répulsifs permettant d'empêcher les cellules « lot » d'envahir la région ventrale et de les aligner le long de la frontière néocortex-éminences ganglionnaires (Figure 20). La **nétrine-1** sécrétée par le cerveau ventral attire les cellules « lot » localement autour de la frontière néocortex-éminences ganglionnaires (Kawasaki et al., 2006). La **sémaphorine 3F** (Séma3F) sécrétée par les régions plus profondes maintient les cellules « lot » à la surface du cerveau par son action répulsive (Ito et al., 2008). Chez les souris invalidées pour l'expression de la Séma3F ou de son récepteur neuropiline 2, les cellules « lot » ne restent pas à la surface du télencéphale comme chez l'embryon de type sauvage, mais envahissent les couches profondes des éminences ganglionnaires médianes (Figure 20, *B*) (Ito et al., 2008).

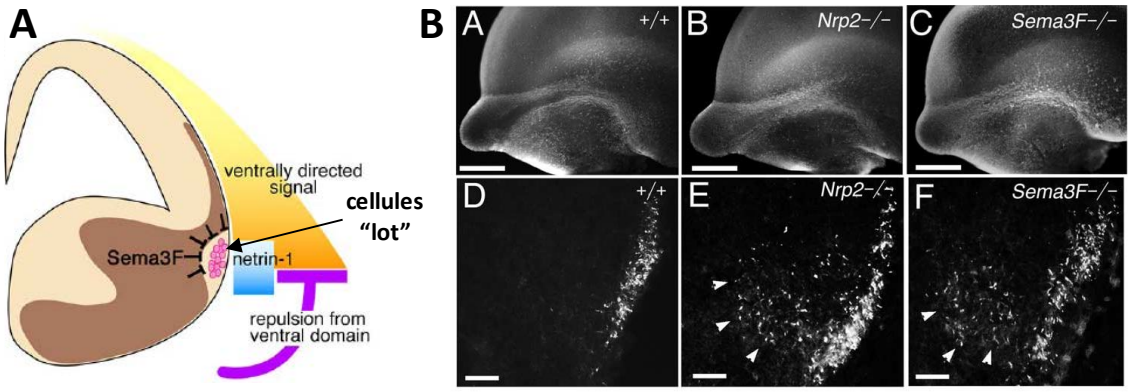


Figure 20 | Mécanismes de guidage contrôlant la migration des cellules « lot » et position ectopique des cellules « lot » chez les embryons mutés pour la neuropiline 2 et la Séma3F. ***A***, Résumé des signaux guidant la migration des cellules « lot ». La nétrine-1 attire les cellules « lot » et la Séma3F les confine dans le territoire présomptif du tractus olfactif latéral. D'autres signaux attirent les cellules « lot » ventralement (*ventrally directed signal*) ou les repoussent (*repulsion from ventral domain*), et régulent leur position. ***B***, Vues latérales de télencéphales (*A-C*) et coupes coronales (*D-E*) d'embryons à E13.5 immunomarqué(e)s avec un anticorps anti-lot1. Les coupes coronales révèlent qu'en absence de neuropiline 2 (*E*) ou de Séma3F (*F*), les cellules « lot » ne restent pas à la surface du télencéphale comme chez l'embryon de type sauvage (*D*), mais envahissent les couches profondes des éminences ganglionnaires médianes (têtes de flèche) (Ito et al., 2008).

Le guidage des axones du tractus olfactif latéral, au niveau de la « route » formée par les cellules « lot », implique quant à lui des molécules de contacts cellulaires, des molécules de la matrice extracellulaire, et des molécules de guidage axonal (Figure 21). Les protéines d'adhérence de la **superfamille L1-CAM** (NCAMH, OCAM, NrCAM, et PSA-NCAM) sont impliquée et ont probablement une action de concert entre elles (Seki and Arai, 1991; Stoeckli and Landmesser, 1995). Les protéines de la **matrice extra-cellulaire**, comme la laminine, la fibronectine et l'anosmine-1, promeuvent la croissance des axones des cellules mitrales *in vitro* (Soussi-Yanicostas et al., 2002). Parmi les molécules de guidage, on compte la **sémaphorine 7A** (Séma7A) ancrée à la membrane par une ancre GPI (GlycosylPhosphatidyl-Inositol). Chez les souris mutées pour la Séma7A, les axones du tractus olfactif latéral se développent rostro-caudalement mais ils ne sont pas orientés et ne forment pas de branches collatérales (Pasterkamp and Kolodkin, 2003). Des molécules de guidage axonal sécrétées, comme les molécules de la famille Slit et de la famille des sémaphorines, ont également été impliquées dans le guidage des axones du tractus olfactif latéral qui expriment les récepteurs des Slits (Robo) et des sémphorines (neuropiline 2). **Slit-1 et Slit-2** sont sécrétés par le septum et ont un effet répulsif sur les axones du tractus olfactif latéral. Chez les souris invalidées pour l'expression de Slit-1 et Slit-2, le tractus olfactif latéral est complètement désorganisé, certains axones pénétrant dans le septum et atteignant la ligne médiane du cerveau (Nguyen-Ba-Charvet et al., 2002) (Figure 22). La **sémaphorine 3B** a une action attractive sur les axones du tractus olfactif latéral et permet de les maintenir à la surface du télencéphale basal, alors que la **sémaphorine 3F** a une action répulsive sur ces axones et les empêche d'envahir la plaque corticale et les éminences ganglionnaires (de Castro, 2009).

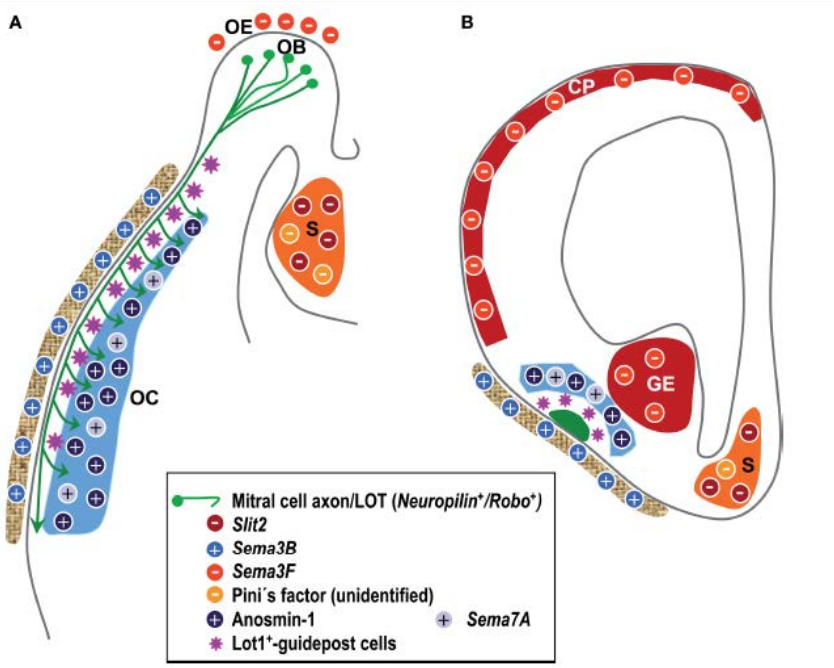


Figure 21 | Molécules de guidage impliquées dans la formation du tractus latéral olfactif. Schémas de sections horizontale (***A***) et coronale (***B***) de cerveau. Les cellules mitrales et touffues et leurs axones représentés en vert, forment le tractus olfactif latéral (LOT). Différents signaux chimio-répulsifs (-) comme la Séma3F ou Slit2 empêchent les axones du tractus olfactif latéral

d'envahir le septum (S), les éminences ganglionnaires (GE) et la plaque corticale (CP), en les maintenant à la surface du télencéphale. Cette position du tractus olfactif latéral est également assurée par les cellules « lot » (étoiles violettes) et des molécules chimio-attractives (+) comme la Séma3B (sécrétée par les progéniteurs des cellules osseuses du crâne), et l'anosmine-1 (produite par le cortex olfactif) (de Castro, 2009).

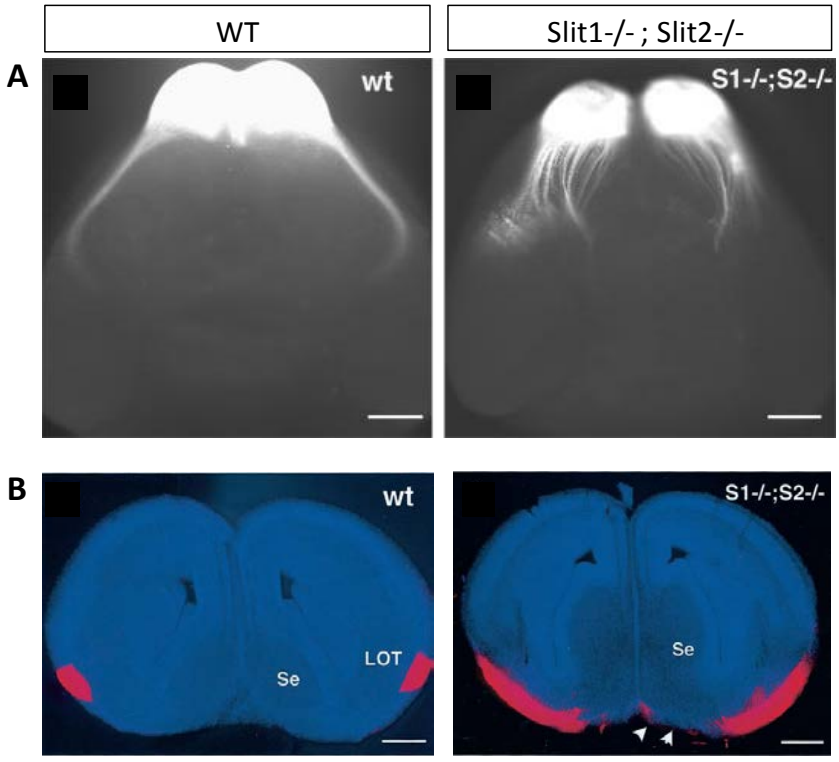


Figure 22 | Défauts du tractus olfactif latéral chez les embryons mutés pour Slit1 et Slit2. ***A-B***, Injections de DiI dans le bulbe olfactif d'embryons de type sauvage (WT) ou déficients pour Slit1 -/- ; Slit2 -/- au stade embryonnaire E15. ***A***, Cerveaux totaux. Chez les embryons WT, le tractus olfactif latéral (LOT) forme un unique faisceau d'axones. Chez les embryons Slit1-/- ; Slit2 -/-, les axones sont défasciculés et envahissent la région ventrale du cerveau. ***B***, Coupes coronales de cerveaux marquées avec un marqueur de noyaux (Hoechst). Chez les embryons WT, le tractus olfactif latéral se situe juste sous la surface piale de chaque côté en position ventro-latérale du télencéphale. Chez les embryons Slit1-/- ; Slit2 -/-, le tractus olfactif latéral s'étend dans toute la partie ventrale du télencéphale et des axones du bulbe olfactif atteignent la ligne médiane et la région septale (Se) (têtes de flèche) (Adapté de Nguyen-Ba-Charvet et al., 2002).

Après avoir formé le tractus olfactif latéral, les axones émettent des **branches collatérales** qui vont envahir la **couche 1** du cortex olfactif et établir des contacts synaptiques avec les dendrites apicales des cellules pyramidales de la couche 2 du cortex olfactif (Schwob and Price, 1984) (Figure 23). Une cellule mitrale individuelle peut ainsi projeter dans différentes régions du cortex olfactif, comme le noyau olfactif antérieur, le cortex piriforme et le tubercule olfactif (Ojima et al., 1984). Après une période d'environ un jour pendant laquelle les axones du tractus olfactif latéral ne bourgeonnent pas, les branches collatérales commencent à se former et envahisent le cortex olfactif selon un ordre précis. Chez la souris, les premières branches collatérales envahissent d'abord l'amygdale à E15.5, puis un jour plus tard, le cortex piriforme et les régions plus rostrales du cortex olfactif (Hirata and Fujisawa, 1999).

La formation des branches collatérales par les axones du tractus olfactif latéral repose également sur des molécules impliquées dans la croissance et le guidage des axones, comme la sémaphorine 7A (Pasterkamp et al, 2003), et l'anosmine-1 (Soussi-Yanicostas et al., 2002), décrites ci-dessus.

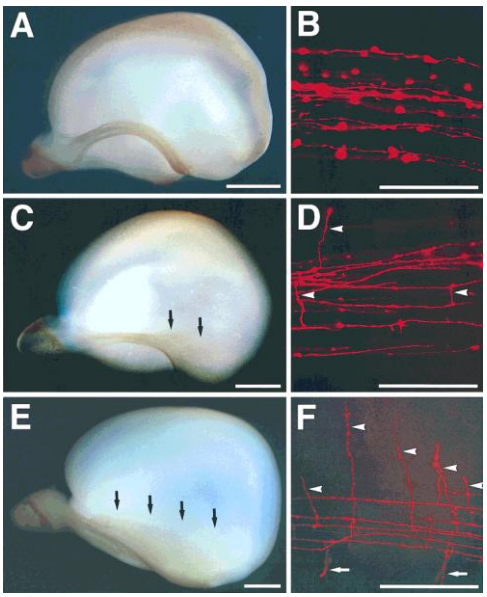


Figure 23 | Formation des branches collatérales des axones des cellules mitrales. ***A***, ***C***, ***E***, Vues latérales de télencéphales entiers d'embryons à E15.5 (*A*), E16.5 (*C*) et E17.5 (*E*) immunomarqués avec un anticorps anti-neuropiline 1 qui marque spécifiquement les axones des cellules mitrales. Les flèches représentent des axones envahissant le cortex olfactif. ***B***, ***D***, ***F***, Axones des cellules mitrales marqués par du DiI au niveau caudo-latéral du tractus latéral olfactif à E15.5 (*B*), E16.5 (*D*) et E17.5 (*F*). Les têtes de flèches représentent les branches collatérales des axones (Hirata and Fujisawa, 1999).

II. LA COMMISSURE ANTERIEURE

A. Anatomie et rôle de la commissure antérieure

Chez les Mammifères, la **commissure antérieure** fait partie des trois faisceaux majeurs de fibres interhémisphériques myélinisées du télencéphale avec le **corps calleux** formé par les axones des neurones de projection du néocortex, et la **commissure hippocampique** formée par les axones des neurones de projection de l'hippocampe.

Chez la souris, la commissure antérieure est un faisceau bipartite, constitué d'une branche dite « antérieure » et d'une branche dite « postérieure ». La branche antérieure (aCA) est formée par les axones du noyau olfactif antérieur et de la partie antérieure du cortex piriforme de chaque hémisphère. La branche postérieure (pCA) est formée par les axones de la partie postérieure du cortex piriforme et par des axones de l'amygdale de chaque hémisphère. Les deux branches de la commissure antérieure traversent la ligne médiane en position rostrale par rapport au troisième ventricule (Figure 24). Les axones de la branche antérieure et de la branche postérieure ne se mélangent jamais (Pires-Neto and Lent, 1993; Cummings et al., 1997) (Figure 25).

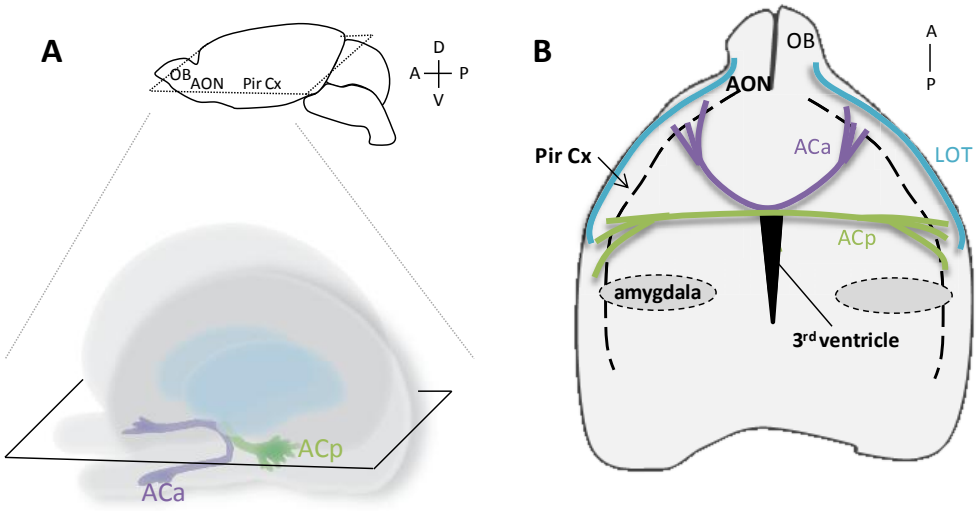


Figure 24 | La commissure antérieure. ***A***, En haut, vue latérale de cerveau avec emplacement du bulbe olfactif (OB), du noyau olfactif antérieur (AON) et du cortex piriforme (Pir Cx). Traits pointillés, plan de coupe utilisé en *B*. En bas, vue en volume des hémisphères du télencéphale, avec les deux branches de la commissure antérieure. ACa, branche antérieure ; ACp, branche postérieure. Le striatum est représenté en bleu clair. ***B***, Schéma de coupe horizontale du télencéphale de souris, au niveau de la commissure antérieure. Tractus olfactif latéral, LOT.

Les commissures du télencéphale transmettent l'information d'un hémisphère cérébral à l'autre, cependant leur fonction dans le traitement de l'information reste à ce jour peu documentée. Les souris présentant des défauts de développement axonal ont très peu été étudiées dans le but de comprendre les conséquences fonctionnelles et comportementales de ces défauts. Les souris

présentant des défauts de commissure antérieure ont le plus souvent des anomalies dans d'autres faisceaux de fibres, comme le corps calleux, la commissure hippocampique, la capsule interne ou les fibres cortico-thalamiques. Il est de fait difficile d'associer un comportement à l'absence de commissure antérieure spécifiquement. Par ailleurs, les études fonctionnelles réalisées dans le cortex piriforme n'investiguent pas le rôle de la commissure antérieure dans l'activité des cortex de chaque hémisphère.

Cependant, une étude récente suggère que l'absence de commissure antérieure chez les souris présentant une haploinsuffisance pour le facteur de transcription **Tbr1** induit des anomalies cognitives (Huang et al., 2014). Les auteurs montrent que les souris Tbr1+/- n'ont pas de branche postérieure de la commissure antérieure et présentent des anomalies de comportement telles que des anomalies d'interactions sociales et des anomalies de préférence de nourriture, sans présenter d'anomalie sensorielle d'olfaction. Les auteurs proposent que ces anomalies de comportement reposent sur l'absence de projections contralatérales de l'amygdale. Cependant, la branche postérieure de la commissure antérieure est également constituée d'axones du cortex piriforme postérieur. Les comportements observés chez ces souris pourraient donc également reposer sur des défauts d'association et d'apprentissage des odeurs au sein du cortex piriforme.

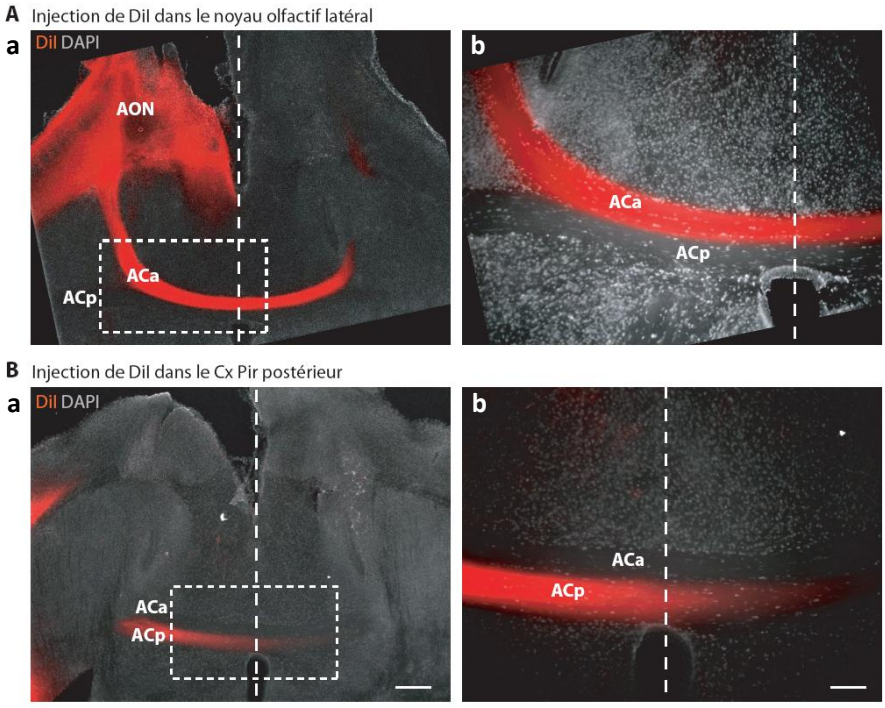


Figure 25 | Les axones de la branche antérieure et de la branche postérieure de la commissure antérieure ne se mélangent pas. ***A*-*B***, Injection de DiI dans des cerveaux fixés à P0 au niveau du noyau olfactif antérieur (AON) (*A*) ou du cortex piriforme (Cx Pir) postérieur (*B*), marquant les axones de la branche antérieure de la commissure antérieure (ACa) et de la branche postérieure de la commissure antérieure (ACp), respectivement. Les axones de l'ACa et de l'ACp traversent la ligne médiane et ne se mélangent pas. La ligne blanche pointillée représente la ligne médiane. *A*-*a*, *B*-*a*, Les cadres représentent les régions montrées à plus fort grossissement en *A*-*b* et *B*-*b*. (données personnelles).

B. Développement précoce de la commissure antérieure

Au cours du développement du cortex, les projections entre hémisphères corticaux ou entre cortex et thalamus se développent grâce à des **axones pionniers** de populations de neurones transitoires situées dans la pré-plaque et plus tard de populations situées dans la sous-plaque (De Carlos and O'Leary, 1992; McConnell et al., 1994). Chez les Mammifères, la commissure antérieure est la première commissure inter-hémisphérique formée au cours du développement du système nerveux.

Pires-Neto et Lent ont identifié les axones pionniers présents avant la formation de la commissure antérieure, chez le hamster (Pires-Neto and Lent, 1993). Ces derniers projetteraient le long de prolongements de cellules gliales qui les guideraient lors de la décussation à la ligne médiane (Cummings et al., 1997). Chez la souris, Schneider et collaborateurs ont montré qu'une population de neurones précoces, générés entre E10.5 et E11.5, exprimant le marqueur Lrp12/Mig13a, forme les axones pionniers de la commissure antérieure dès **E13.5** (Schneider et al., 2011). Ces neurones localisés dans la pré-plaque juqu'à E14.5, sont ensuite trouvés dans la sous-plaque jusqu'à E18.5, l'expression de Lrp12/Mig13a déclinant dans la période post-natale. Les axones des neurones positifs pour Lrp12/Mig13a expriment la molécule d'adhésion L1CAM. Ils projettent dans la zone intermédiaire avant de naviguer dans le sub-pallium (Figure 26).

Entre E14.5 et E16.5, la commissure antérieure se développe complètement. En comparaison, les axones pionniers du corps calleux qui proviennent des neurones du cortex cingulaire ne se mettent en place qu'à E15.5 et le corps calleux n'est complètement formé qu'à partir de E18.5 (Nishikimi et al., 2013).

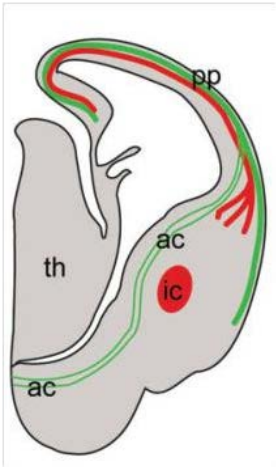


Figure 26 | Les axones pionniers de la commissure antérieure à E13.5. Les neurones positifs pour Lrp12/Mig13a présents dans la pré-plaque (pp) forment des axones pionniers de la commissure antérieure (ac) (en vert) dès E13.5. Les fibres corticofugales (en rouge) sont positives pour TAG-1 et projettent dans le sub-pallium avant d'atteindre le thalamus (th). Les fibres corticothalamiques sont visibles dans la capsule interne (ic) (Schneider et al., 2011).

C. Croissance et guidage des axones

Le développement des axones de la commissure antérieure repose sur des mécanismes complexes, communs au développement de tous les faisceaux de fibres du cerveau. Les axones vont croître en suivant une « route » précise, pour atteindre leur cible et former des connexions appropriées. De fait, la croissance axonale ne peut être totalement dissociée du guidage axonal, la croissance des axones étant toujours dirigée vers une région-cible du cerveau. Le cône de croissance, extrêmité distale et dynamique de l'axone, est le siège de l'intégration des signaux environnementaux qui vont permettre la croissance et le guidage de l'axone.

Le cône de croissance a été identifié en 1890 par Ramon y Cajal, sur des coupes de moelles épinières marquées avec une coloration de Golgi (Figure 27). En 1910, Hans Spemann et Ross Harrison réalisent les premières cultures de tissus neuronaux. Ils identifient le cône de croissance ou « organisateur » comme une structure mobile et dynamique, qui peut adopter des morphologies et des tailles très variables. Le cône de croissance émet des protrusions membranaires, appelées filopodes, qui vont lui permettre de sonder constamment l'environnement. Les lamellipodes constituent également une région très dynamique mais ne forment pas de protrusions. Les **filopodes** et **lamellipodes** forment la région périphérique mobile du cône de croissance. La région centrale du cône de croissance, connectée à l'axone, est moins mobile (Figure 27).

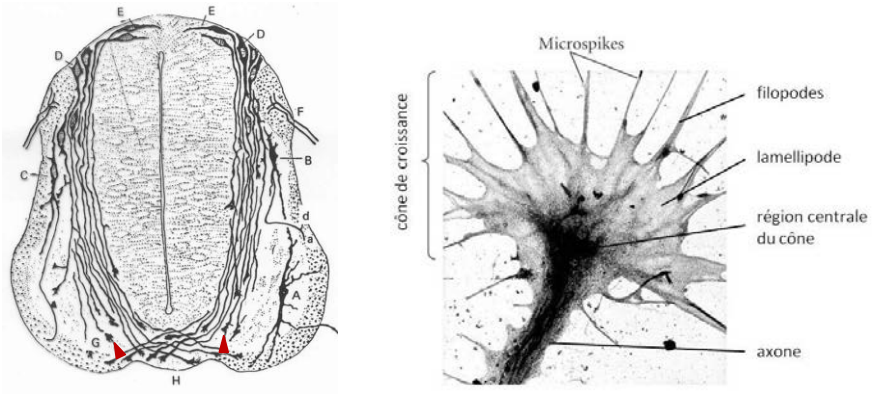


Figure 27 | Identification du cône de croissance. A gauche, dessin de coupe de moelle épinière marquée à la coloration de Golgi. Les têtes de flèche rouges montrent des cônes de croissance (Ramon y Cajal, 1890). A droite, cône de croissance de neurone d'aplysie en culture observé en contraste de phase (Spemann and Harrison, 1910).

La **mobilité** et le **guidage** du cône de croissance repose sur des mécanismes complexes et interdépendants (Vitriol and Zheng, 2012) (Figure 28). La progression d'un cône de croissance implique tout d'abord une **protrusion membranaire** au front de migration et une rétraction à l'arrière du cône. Ces processus sont contrôlés par des interactions réciproques entre l'**actine** et les **microtubules** d'une part, et par l'ajout de **membrane plasmique** au front de migration d'autre part. L'environnement dans lequel navigue le cône de croissance constitue un substrat, avec lequel le cône va former des contacts ou adhésions. La formation de nouvelles **adhésions**

au front de migration et la destruction de ces adhésions à l'arrière du cône de croissance sont donc nécessaires à sa progression. Enfin, le cône de croissance exprime des récepteurs aux **facteurs de croissance** et aux **molécules de guidage**, qui vont respectivement stimuler la croissance et la diriger. Les facteurs de croissance et les molécules de guidage axonal sont sécrétés ou exprimés par les tissus environnant les axones, au cours de leur développement. Les molécules de guidage axonal vont diriger la croissance de l'axone grâce à l'activation de voies de signalisation permettant l'attraction ou la répulsion du cône de croissance. En réponse à des signaux répulsifs, le cône de croissance va « collapser ». La « collapse » d'un cône de croissance implique la rétraction des filopodes et la disparition des lamellipodes, et conduit à la rétraction de l'axone.

Le **renouvellement** des molécules transmembranaires, molécules d'adhésion et récepteurs, et la régulation de leur **localisation à la membrane** sont essentiels au contrôle de la direction de migration du cône de croissance. L'**endocytose** et l'**exocytose** de recyclage permettent de réguler la localisation des molécules transmembranaires à la membrane (Disanza et al., 2009; Jones et al., 2006). L'endocytose a lieu préférentiellement dans le domaine central du cône de croissance et permet l'internalisation des molécules transmembranaires. Les vésicules intracellulaires contenant des cargos spécifiques sont transportées de manière antérograde et fusionnent avec la membrane (exocytose) dans le domaine périphérique du cône de croissance, permettant l'addition de molécules transmembranaires à la membrane (Alberts et al., 2006; Bonanomi et al., 2008; Dequidt et al., 2007; Diestel et al., 2007; Eva et al., 2010; Kamiguchi and Lemmon, 2000b; Kamiguchi and Yoshihara, 2001).

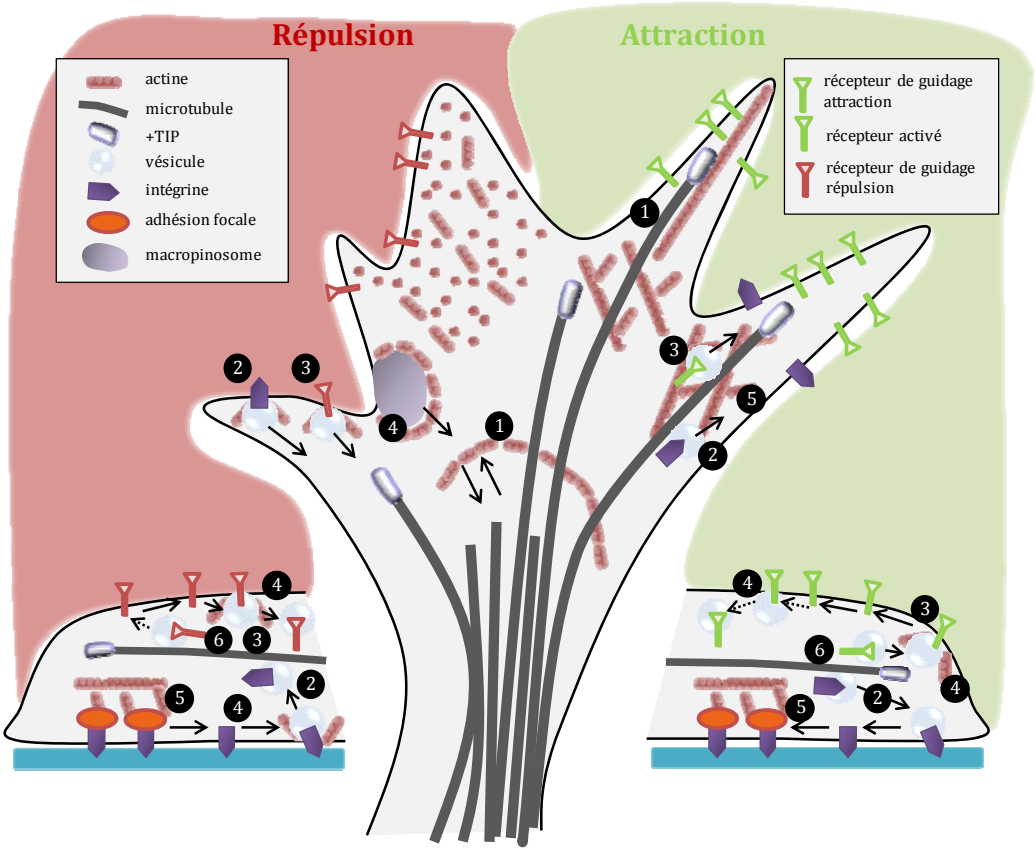


Figure 28 | Complexité et interactions des mécanismes à l'origine de la mobilité et du guidage du cône de croissance. (1) Protrusion membranaire au front de migration et rétraction en arrière du cône. **(2)** Formation de nouvelles adhésions au front de migration et destruction des adhésions en arrière du cône, par recyclage membranaire. **(3)** Régulation du nombre et de la distribution des récepteurs de guidage axonal à la surface du cône grâce au trafic vésiculaire. **(4)** Le cytosquelette d'actine régule également l'endocytose et l'exocytose de manière spatio-temporelle, ce qui influence l'adhésion et le recyclage des récepteurs. **(5)** Le cytosquelette d'actine fait partie du complexe d'adhésion dépendant des intégrines ; il régule la stabilité et le renouvellement des adhésions. **(6)** Les microtubules jouent un rôle dans le trafic des récepteurs membranaires (Adapté de Vitriol and Zheng, 2012).

Dans la suite de cette partie seront présentés les mécanismes généraux permettant la migration des cônes de croissance dans leur environnement et donc la croissance axonale d'une part, et des mécanismes plus spécifiques de guidage axonal d'autre part. Parmi les mécanismes généraux, j'aborderai l'importance du cytosquelette et des protéines associées au niveau du cône ; du contrôle de la surface membranaire en lien avec la mobilité du cône ; et des adhésions cellulaires et des contacts avec la matrice extracellulaire. Dans la partie sur les mécanismes de guidage axonal, j'aborderai plus spécifiquement la réponse à certaines molécules de guidage, dont les protéines de la famille des sémaphorines et des ephrines.

1. Cytosquelette du cône de croissance et protéines associées

a) Actine, microtubules et mobilité du cône de croissance

La croissance axonale repose sur la polymérisation du cytosquelette d'actine et de microtubules à l'extrêmité distale de l'axone. Des marquages du cytosquelette ont montré que **l'actine filamenteuse** (F), ou microfilaments d'actine, est enrichie dans les **filopodes** et **lamellipodes** des cônes de croissance. Les **microtubules** n'envahissent que rarement la région périphérique du cône de croissance mais sont organisés de manière très dense dans sa **région centrale** (Dent and Gertler, 2003; Lowery and Van Vactor, 2009)(Figure 29).

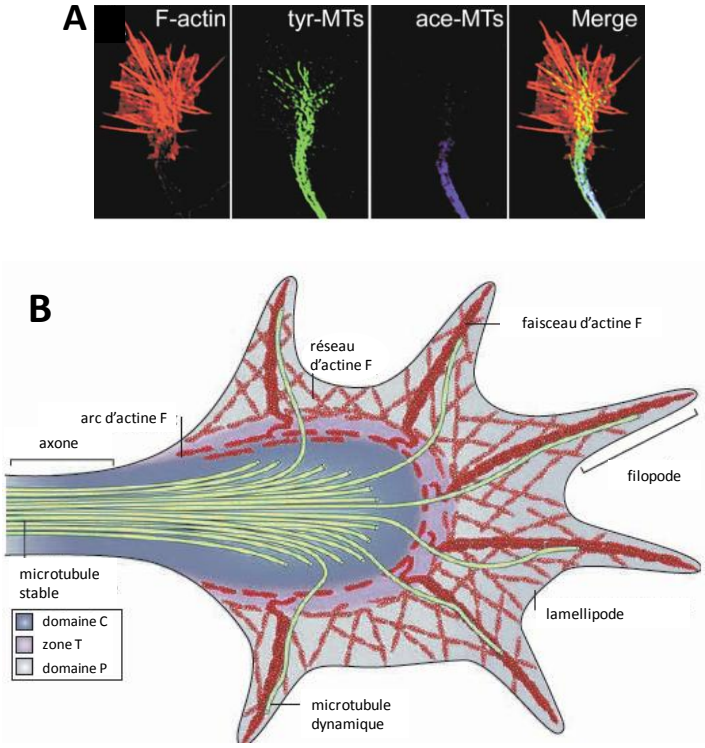


Figure 29 | Organisation du cytosquelette au cône de croissance. ***A***, Immunomarquage permettant de visualiser l'actine filamenteuse (F), les microtubules tyrosinés (tyr-MTs) et les microtubules acétylés (ace-MTs) au cône de croissance (Adapté de Dent and Gertler, 2003). ***B***, Schéma résumant l'organisation du cytosquelette au cône. L'actine F est localisée dans la région périphérique du cône (domaine P), les microtubules tyrosinés (tyr-MTs) envahissent la région centrale (domaine C) du cône et certains filopodes, les microtubules acétylés (ace-MTs) sont retrouvés dans l'axone. La zone T est la zone de transition entre les domaines C et P (Adapté de Lowery and Van Vactor, 2009).

L'actine F est un polymère d'actines globulaires, qui adoptent une conformation hélicoïdale dextre. Les filaments d'actine sont polarisés : l'extrémité (+) va capter en très grande majorité l'ATP-actine, favorisant la polymérisation ; l'extrémité (-) est moins active, l'actine du filament qui en est proche est majoritairement sous forme d'ADP-actine (Figure 30). Par conséquent, à l'extrémité (-) l'équilibre est déplacé vers la dépolymérisation (Pollard and Borisy, 2003).

Au niveau du cône de croissance, les filaments d'actine polymérisent dans la partie la plus périphérique du cône ; de fait l'actine présente un **mouvement rétrograde** de la périphérie vers le centre du cône de croissance, mouvement pour la première fois identifié dans des cultures de neurones d'Aplysia par Lin et Forscher (Lin and Forscher, 1995). Il a initialement été montré que la dépolymérisation de l'actine F induit la rétraction des filopodes et l'arrêt de la croissance axonale (Yamada et al., 1971; Yamada and Wessells, 1971). Ces résultats sont controversés et plusieurs études ont montré que la dépolymérisation de l'actine F n'empêche pas la croissance axonale, mais affecte le comportement exploratoire du cône de croissance et sa capacité à répondre à des molécules de guidage axonal (Kaufmann et al., 1998; Dent and Kalil, 2001).

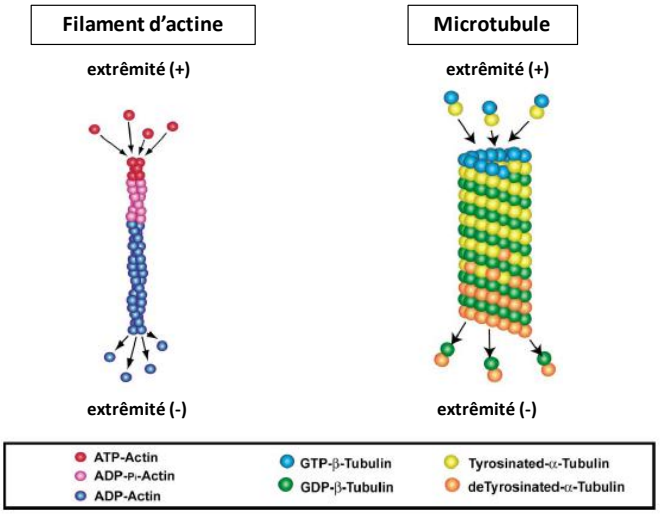


Figure 30 | Les filaments d'actine et les microtubules sont des polymères polarisés (Adapté de Dent and Gertler, 2003).

Les microtubules sont formés de dimères de tubuline, composés de deux sous-unités, la tubuline α et la tubuline β, liées par des liaisons non-covalentes. Les dimères sont associés bout à bout en protofilaments. Les microtubules sont en général constitués de 13 protofilaments. Une extrémité des microtubules ne présente que des tubulines β, l'autre extrémité que des tubulines α. Ces extrémités sont appelées extrémités (+) et (-), respectivement (Figure 30). L'extrémité (+) est celle qui polymérise le plus rapidement. L'extrémité (-) est stabilisée et généralement liée au centre de nucléation (centrosome) du microtubule, quelle que soit sa localisation dans la cellule. Des modifications post-traductionnelles affectent la dynamique des microtubules : les microtubules possédant un résidu tyrosine à l'extrémité carboxy-terminale sont dynamiques. Lorsque l'âge du polymère augmente, les microtubules vont être dé-tyrosinés, ce qui entraîne une diminution de leur dynamique. Certains microtubules tyrosinés vont être retrouvés dans la région périphérique du cône de croissance où ils interagissent avec l'actine et des composants de voies de signalisation, ce qui joue un rôle dans la mobilité du cône de croissance. La dépolymérisation des microtubules conduit à la rétraction des axones (Yamada and Wessells, 1971).

L'**orientation des microtubules** explorant la périphérie du cône de croissance prédit généralement la direction de croissance (Sabry et al., 1991; Tanaka et al., 1995). Des études ont montré que ces microtubules dynamiques étaient des éléments-clé pour le guidage axonal. Plus particulièrement, des protéines associées aux extrêmités (+) des microtubules, ou +TIPs, comme les protéines EB (pour *End-Binding*) ou les protéines CLIP (pour C*ytoplasmic-Linker Protein*) seraient impliquées dans la réponse des cônes de croissance aux signaux environnementaux (Lowery and Van Vactor, 2009).

Les microtubules ont par ailleurs une fonction de **« rails »** dans la cellule sur lesquels vont être transportés des **organelles** comme les mitochondries, et des **vésicules**. Le transport le long des microtubules a lieu grâce à des protéines associées aux microtubules (MAP, pour *Microtubule Associated Protein*) et à des protéines motrices, les kinésines pour le transport antérograde et la dynéine pour le transport rétrograde. Les mitochondries permettent la synthèse locale d'ATP et la régulation de la concentration de calcium au cône de croissance (Ruthel and Hollenbeck, 2003; Cheng et al., 2010). Le transport vésiculaire joue un rôle particulièrement important dans l'apport puis le recyclage des récepteurs et des molécules d'adhésion à la membrane. Les vésicules intracellulaires transportent également le long des microtubules des protéines de signalisation ayant un rôle dans les réorganisations du cytosquelette comme la kinase **Src** et les petites GTPases de la famille Rho, **Rac** et **Cdc42** (Osmani et al., 2010; Palamidessi et al., 2008; Wu et al., 2008). Le calcium est un régulateur important du trafic vésiculaire au cône de croissance. Ainsi, des signaux calciques attractifs stimulent le transport centrifuge des vésicules membranaires le long des microtubules et leur exocytose assurée par VAMP2, du côté où la concentration de Ca^{2+} est élevée (Akiyama and Kamiguchi, 2010; Tojima et al., 2007). Au contraire, des signaux calciques répulsifs conduisent à l'endocytose assurée par la clathrine du côté où la concentration de Ca^{2+} est élevée (Tojima et al., 2010), avant même d'induire les réorganisations du cytosquelette observées lors de la réponse du cône de croissance. Dans ce contexte, l'inhibition de l'endocytose est suffisante pour transformer une réponse répulsive en attraction.

b) Les petites GTPases

Les **petites GTPases** régulent la dynamique du cytosquelette. La superfamille des petites GTPases Ras est représentée par presque 200 protéines différentes, classées en 6 sous-familles : Rho, Ras, Rab, Arf, Sar et Ran (Colicelli, 2004). Ces protéines catalysent la perte d'un phosphate du GTP conduisant à la production de GDP. Elles agissent comme des interrupteurs moléculaires, transitant entre un état inactif (liées au GDP) et un état actif (liées au GTP). La conformation active permet leur interaction avec des effecteurs spécifiques, conduisant à l'activation de voies de signalisation en aval. Ces voies de signalisation influencent de nombreux aspects de la biologie de la cellule. Les facteurs d'échange de nucléotide guanine GEFs (pour *Guanine Exchange Factors*) catalysent l'échange du GDP en GTP, alors que les protéines activatrices des GTPases GAPs (pour *GTPase Activating Proteins*) augmentent l'activité intrinsèque des GTPases, stimulant la perte du phosphate et la transition vers l'état inactif (Rossman et al., 2005).

Les protéines de la superfamille Ras GTPases sont connues pour contrôler **l'assemblage, le désassemblage et la dynamique du cytosquelette d'actine et de microtubules**. Les Ras GTPases sont activées par un grand nombre de protéines transmembranaires et stimulent de nombreuses voies de signalisation dont celles des MAPK et PI3K. Elles ont un rôle crucial dans l'initiation, l'élongation et le guidage des axones (Hall and Lalli, 2010). Ainsi, la famille des **petites Ras GTPases de type Rho** a été impliquée dans le guidage axonal et la traversée de la ligne médiane des projections commissurales (Govek et al., 2005). Plusieurs études ont montré que Rac, Cdc42 et RhoG promeuvent l'extension et la mobilité des cônes de croissance en réponse à des molécules de guidage axonal, alors que RhoA contrôle la rétraction des neurites *via* la collapse du cône de croissance (Dickson, 2001).

c) Les protéines ERMs

Les protéines ERMs, **ezrine**, **radixine** et **moesine**, appartiennent à la superfamille des protéines 4.1 qui se caractérisent par leur domaine amino (N)-terminal FERM (pour F*our-point one, Ezrin, Radixin, Moesin*) impliqué dans leurs interactions avec des protéines transmembranaires (Fehon et al., 2010) (Figure 31). Leur domaine carboxy (C)-terminal interagit directement avec l'actine filamenteuse. Les protéines ERMs font partie du cytosquelette cortical de la cellule. Elles participent à l'organisation de la membrane plasmique, à la transduction de signaux extracellulaires, à l'attachement du cytosquelette à la membrane et à la régulation de la localisation des protéines transmembranaires (Bretscher et al., 2000; Bretscher et al., 2002). Par ailleurs, les protéines ERMs interagissent avec des régulateurs des petites GTPases de type Rho et jouent de fait un rôle important dans leur activation (Hirao et al., 1996; Mackay et al., 1997). Les fonctions cellulaires des protéines ERMs sont donc multiples et particulièrement importantes dans les voies de signalisation contrôlant l'adhésion, la morphologie et la mobilité cellulaires (McClatchey and Fehon, 2009).

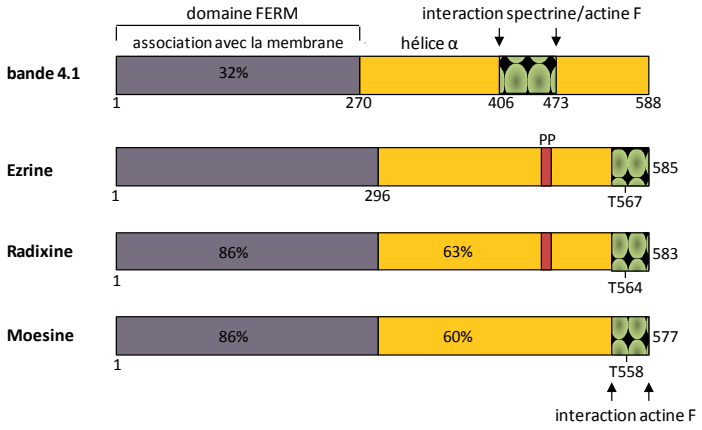


Figure 31 | Domaines structuraux de la protéine bande 4.1 (érythrocyte) et des ERMs. Les régions N-terminales contiennent un domaine FERM (pour *Four-point one, Ezrin, Radixin, Moesin*) d'environ 300 résidus, caractéristique des protéines 4.1. Les ERMs ont un domaine C-terminal d'interaction avec l'actine filamenteuse (F). La région entre le domaine FERM et le domaine C-terminal peut potentiellement former une hélice α de type *coiled-coil*. L'ezrine et la radixine des

Mammifères ont une région riche en prolines (PP), dont la fonction est inconnue, ce qui n'est pas le cas de la moesine. Les pourcentages d'homologies avec l'ezrine sont représentés. Les protéines ERMs peuvent interagir de manière intramoléculaire *via* leurs domaines C-terminal et N-terminal. La phosphorylation de la thréonine (T) diminue les interactions intramoléculaires (Adapté de Bretscher et al., 2002).

Les protéines ERMs sont fortement exprimées au cours des stades précoces de croissance axonale et enrichies au niveau des **cônes de croissance**, où elles interagissent directement avec le cytosquelette d'actine (Gonzalez-Agosti and Solomon, 1996; Paglini et al., 1998). La localisation des ERMs aux cônes de croissance est spécifique à chacune d'entre elles. La radixine est localisée dans le domaine périphérique du cône au niveau des lamellipodes et des filopodes alors que l'ezrine et la moesine sont principalement localisées dans la région centrale du cône et dans l'axone (Marsick et al., 2012b) (Figure 32). Une autre étude a montré que la radixine et la moesine régulent l'organisation du cytosquelette des cônes de croissance de neurones d'hippocampe en culture, contrôlant ainsi leur morphologie et leur dynamique. De plus, la suppression de la radixine et de la moesine dans ces neurones entraîne une diminution de la taille des neurites comparée aux neurones contrôles et empêche l'initiation de l'axone (Paglini et al., 1998). Un des premiers événements qui précède la formation axonale est l'apparition d'un cône de croissance de taille plus importante à l'extrémité de l'un des neurites mineurs (Bradke and Dotti, 1997). Aucune augmentation de la taille des cônes n'est visible dans les neurones où l'expression de la radixine et de la moesine a été supprimée. Les protéines ERMs pourraient directement réguler la **stabilité des microfilaments d'actine**, en encapsulant leurs extrémités (+) (Tsukita and Hieda, 1989).

L'**activité des protéines ERMs** est négativement régulée par l'interaction intramoléculaire entre leur domaine N-terminal et leur domaine C-terminal, qui masque les domaines d'interaction avec certains de leurs partenaires (Figure 33). Lorsque les domaines N- et C-terminaux interagissent, les protéines ERMs sont sous la forme inactive dite « fermée ». L'interaction intramoléculaire peut être abolie suite à des signaux cellulaires variés et la conformation de la protéine devient « ouverte », ou active. Les voies de signalisation assurées par la kinase Rho et par les phospholipides, comme le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2), font partie des signaux cellulaires impliqués dans ce changement de conformation (Matsui et al., 1998; Hirao et al., 1996). Ils aboutissent à la phosphorylation d'un résidu thréonine conservé des ERMs dans la partie C-terminale, qui abolit les interactions intramoléculaires entre les domaines N- et C-terminaux (Figure 33). Des anticorps reconnaissant le domaine C-terminal phosphorylé des ERMs (cpERMs) ont permis de déterminer la **localisation des ERMs actives** au niveau du cône de croissance (Figure 32). Dans des conditions de culture basales, seul un tiers des cônes de croissance de neurones corticaux dissociés présentent des ERMs actives. Parmi les cônes de croissance marqués, les ERMs actives sont concentrées dans une sous-population de filopodes au niveau du cône de croissance. Les filopodes présentant un fort marquage pour les ERMs actives sont la plupart du temps

faiblement marqués pour l'actine filamenteuse. Cependant aucune corrélation n'a pu être faite entre la morphologie des cônes et la localisation des ERMs actives (Mintz et al., 2008).

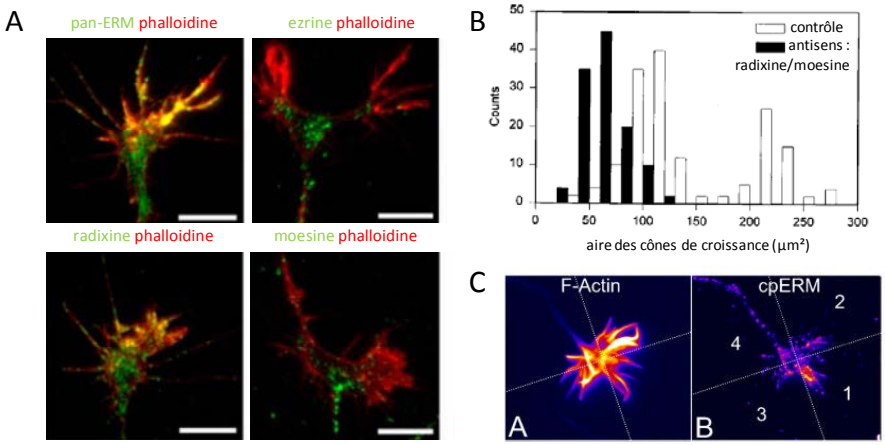


Figure 32 | Localisation et rôle des protéines ERMs au cône de croissance. ***A***, Localisation des ERMs aux cônes de croissance de neurones de la racine dorsale des ganglions d'embryon de poulet, visualisée par immunomarquages. L'anticorps anti-pan-ERM montre la localisation de toutes les protéines ERMs. Les anticorps spécifiques montrent que la radixine est présente dans les régions périphériques (lamellipodes et filopodes) des cônes, alors que l'ezrine et la moesine sont localisées dans la région centrale du cône (Adapté de Marsick et al., 2012b). ***B***, Diminution de l'aire des cônes de croissance de neurones hippocampiques à 2 jours en culture après suppression de l'expression de la radixine et de la moesine grâce à des oligonucléotides antisens (Adapté de Paglini et al., 1998). ***C***, Localisation des ERMs actives (cpERMs) aux cônes de croissance de neurones corticaux dans une sous-population de filopodes (Adapté de Mintz et al., 2008).

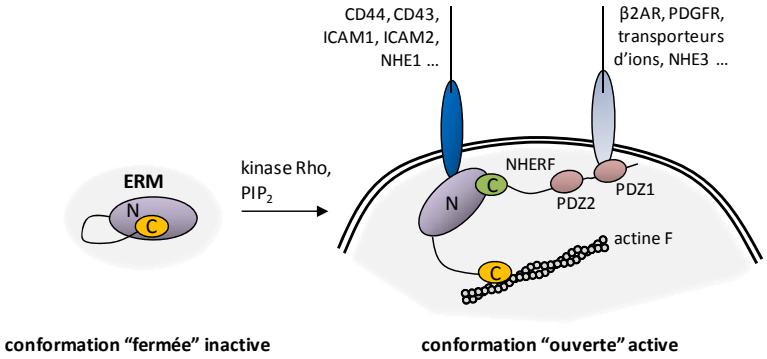


Figure 33 | Modèle d'activation des protéines ERMs. L'interaction intramoléculaire des domaines C- et N-terminaux des protéines ERMs les maintient en configuration « fermée » inactive. Les phospholipides comme PIP_2 et la voie de signalisation via la kinase Rho inhibent l'interaction intramoléculaire des protéines ERMs qui vont changer de conformation et adopter une forme « ouverte » active, ce qui permet leurs interactions directes ou via NHERF (pour *sodium/hydrogen exchanger regulatory factor*) avec des partenaires membranaires et le cytosquelette d'actine. β2AR, β2-*adrenergic receptor* ; ICAM, *intercellular adhesion molecule* ; PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor* (Adapté de Ramesh, 2004).

2. Contrôle de la surface membranaire au cône de croissance

L'élongation de l'axone ne repose pas uniquement sur la polymérisation du cytosquelette mais aussi sur l'**addition de nouvelle membrane** à son extrémité distale. Les vésicules cytoplasmiques sont transportées de manière antérograde le long de l'axone et permettent, suite à leur exocytose locale, l'ajout de membrane au cône de croissance (Lockerbie et al., 1991; Martinez-Arca et al., 2001; Pfenninger and Friedman, 1993; Sabo and McAllister, 2003; Chernyshova et al., 2011).

La diminution de la surface membranaire au cône de croissance grâce à des processus d'endocytose va permettre la rétraction de l'axone et la collapse du cône (Fournier et al., 2000 ; Jurney et al., 2002 ; Kolpak et al., 2009). Cependant, l'endocytose est également un processus important pour l'élongation axonale, car elle permet des modifications morphologiques au sein du cône de croissance d'une part, et le renouvellement des molécules d'adhésion au front de migration du cône d'autre part. Ainsi, la membrane d'un cône est entièrement remplacée en 30 minutes (Diefenbach et al., 1999). Les mécanismes impliqués dans ces processus restent peu connus (Bonanomi et al., 2008; Masur et al., 1990; Mundigl et al., 1998; Nishimura et al., 2003b).

Au cours des stades précoces de développement neuronal, l'**endocytose de grosses vésicules**, apparentée à la **macropinocytose**, assurerait le recyclage de la membrane plasmique, et permettrait l'enlèvement rapide de grandes quantités de membrane plasmique au cône de croissance (Bonanomi et al., 2008). Cette voie génère de larges compartiments au niveau des sites où la membrane adopte une conformation plissée (*ruffling*), riches en actine corticale. Elle est dépendante de la kinase phosphatidylinositol 3 (PI3K), de la petite GTPase Rac1 et de la protéine chaperonne pinocytique Pincher.

Une étude plus récente a par ailleurs montré que l'enlèvement rapide de membrane était le plus souvent confiné à des sous-domaines du cône de croissance (Hines et al., 2012). Dans cette étude, les processus d'endocytose sont analysés grâce à des techniques d'imagerie confocale en temps réel permettant la détection de vésicules uniques formées à partir de la membrane plasmique du cône de croissance marquée par le FM 5-95 (marqueur lipophilique membranaire) (Figure 34). L'enlèvement rapide de membrane et la formation de petites vésicules sont observés au niveau des contacts entre deux filopodes, entre un filopode et un lamellipode, entre les lamellipodes, mais aussi au niveau de la bordure latérale des lamellipodes et des crêtes dorsales du cône de croissance (Figure 34). La disparition des filopodes suite à un contact avec le corps du cône de croissance ou avec d'autres filopodes est corrélée avec l'enlèvement important de membrane par endocytose. De plus, la stimulation de la mobilité du cône de croissance par un substrat (ici la fibronectine) est corrélée avec une augmentation du taux d'endocytose au niveau du cône. La formation des vésicules aux sites de contacts est sensible à la cytochalasine D, ce qui montre l'implication de la polymérisation de l'actine F dans ces processus. En outre, les auteurs montrent la présence de compartiments membranaires plus larges, comme les tubules et les vacuoles (Figure 34). L'enlèvement de membrane rapide au cône de croissance est donc un processus complexe, la formation des vésicules étant contrôlée spatialement et temporellement au sein du cône de croissance.

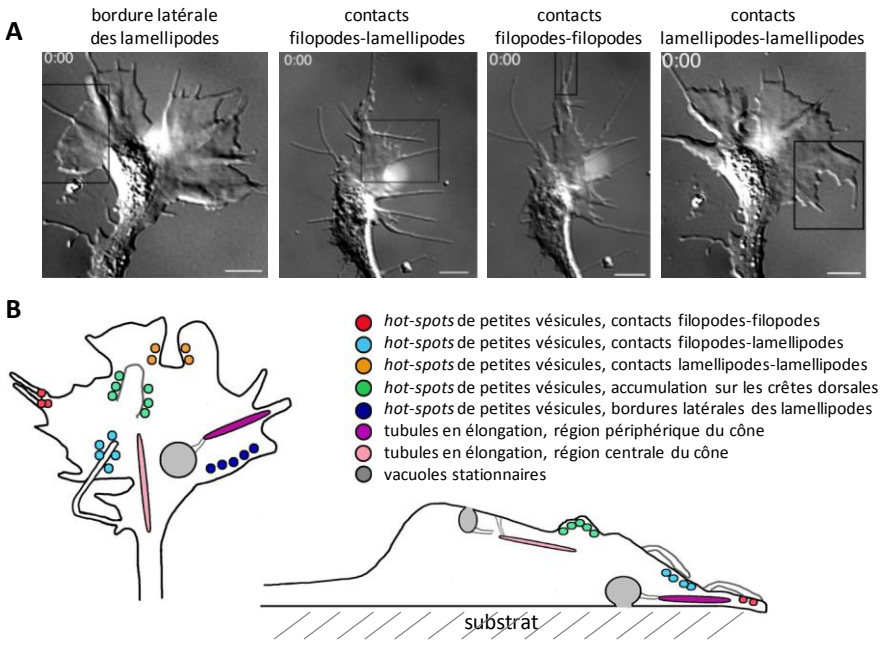


Figure 34 | Distribution des processus d'endocytose au cône de croissance. ***A***, Cônes de croissance de neurones de moelle épinière de Xénope en culture observés en contraste de phase. Illustrations des régions actives d'endocytose au sein du cône de croissance, encadrées en noir. ***B***, Résumé des modes d'endoytose au sein du cône de croissance. Le cône de croissance vu du dessus est représentée à gauche. Le cône de croissance coupé de manière sagittale est représenté à droite, vers le bas se situe la région du cône en contact avec le substrat. Les couleurs des vésicules, des tubules ou des vacuoles correspondent à la légende à droite (Adapté de Hines et al., 2012).

3. Adhésions cellulaires et contacts avec la matrice extracellulaire

Les **molécules d'adhésions cellulaires** servent de récepteurs pour des molécules permissives liées au substrat, qui facilitent la croissance axonale (Kamiguchi and Yoshihara, 2001). Les adhésions cellulaires sont des complexes dynamiques dont le renouvellement continu est essentiel à la mobilité des cellules. Pour qu'un cône de croissance soit mobile, les adhésions doivent s'assembler et se désassembler pour changer en nombre, taille et position. Ceci génère des forces de traction permettant la migration du cône, et influence les voies de signalisation intracellulaires (Myers et al., 2011; Thoumine, 2008). Dans les cônes de croissance, l'adhésion est assurée par les protéines d'adhésion de la famille CAM (pour *Cell Adhesion Molecule*), telles que les **intégrines**, les **cadhérines** et les protéines de la superfamille des **immunoglobulines** (IgCAMs) (Neugebauer et al., 1988; Letourneau and Shattuck, 1989; McKerracher et al., 1996; Agius et al., 1996; Cheng and Lemmon, 2004; Chen et al., 2005; Blackmore and Letourneau, 2006; Kiryushko et al., 2004). Les ligands des intégrines sont localisés dans la matrice extracellulaire (laminine, fibronectine, collagène, vitronectine), alors que les cadhérines et les protéines IgCAMs interagissent de manière homophilique avec des protéines exprimées à la surface des cellules voisines (Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011).

Les protéines CAMs sont couplées au flux rétrograde d'actine F dans le cône de croissance, *via* des interactions de leur domaine cytoplasmique avec des protéines adaptatrices (Jay, 2000). Le complexe moléculaire formé par les protéines CAMs à la membrane, les protéines adaptatrices et le cytosquelette d'actine est appelé complexe « géant » (ou *clutch*). Des complexes « géants » ont été identifiés pour chaque famille de protéines CAMs :

- Les **intégrines** sont liées au cytosquelette d'actine F *via* les protéines **taline** et **vinculine** (Giannone et al., 2009).
- La **cadhérine N** est liée au cytosquelette d'actine F *via* les **caténines** (Bard et al., 2008).
- **L1CAM** est liée au cytosquelette d'actine F *via* l'**ankyrine B** (Kamiguchi and Yoshihara, 2001 ; Nishimura et al., 2003a), **shootine 1** (Shimada et al., 2008) et l'**ezrine** (Sakurai et al., 2008).

Les protéines CAMs interagissent donc avec le cytosquelette d'actine F de la cellule et avec des ligands relativement immobiles dans la matrice extracellulaire ou sur les cellules voisines. L'hypothèse est que l'engagement de ces protéines dans ces complexes « géants » permet la **transmission de forces** tirant le substrat extracellulaire dans la direction opposée au front de migration *via* le flux rétrograde d'actine F (Chan and Odde, 2008), ce qui en retour permet la **translocation du cône de croissance** vers l'avant (Giannone et al., 2009). Un tel mécanisme a été décrit pour la protéine NrCAM (Faivre-Sarrailh et al., 1999) et a été plus largement documenté pour la protéine L1CAM.

Les protéines L1-CAM de la superfamille IgCAMs, L1CAM, NrCAM et neurofascine, ont une structure globale commune : elles possèdent une grande région extracellulaire avec plusieurs domaines immunoglobuline et fibronectine (FN III), une région transmembranaire hydrophobe et une courte queue cytoplasmique. Ces protéines possèdent toutes un motif cytoplasmique conservé **SKIGQY**, permettant leur interaction avec l'ankyrine (Garver et al., 1997; Hortsch, 2000). L'ankyrine ancre ces molécules transmembranaires au cytosquelette d'actine grâce à son interaction avec la spectrine. L'association avec l'ankyrine est finement régulée par la phosphorylation du résidu tyrosine (Y) du motif d'interaction, qui inhibe l'interaction.

Des interactions spécifiques du domaine cytosplasmique de chaque protéine de la famille L1-CAM avec diverses protéines ont également été décrites (Herron et al., 2009) (Figure 35). La protéine **L1CAM** interagit directement avec le domaine FERM des **protéines ERMs**, *via* un motif d'interaction **YRSLE** (Kamiguchi et al., 1998; Dickson et al., 2002). Le domaine d'interaction de L1CAM aux ERMs recouvre un domaine d'interaction avec **AP-2**, protéine adaptatrice de la clathrine, importante pour l'endocytose. Il a été proposé que l'interaction avec les protéines ERMs pourrait réguler l'endocytose de L1CAM par compétition avec AP-2 (Dickson et al., 2002; Cheng et al., 2005).

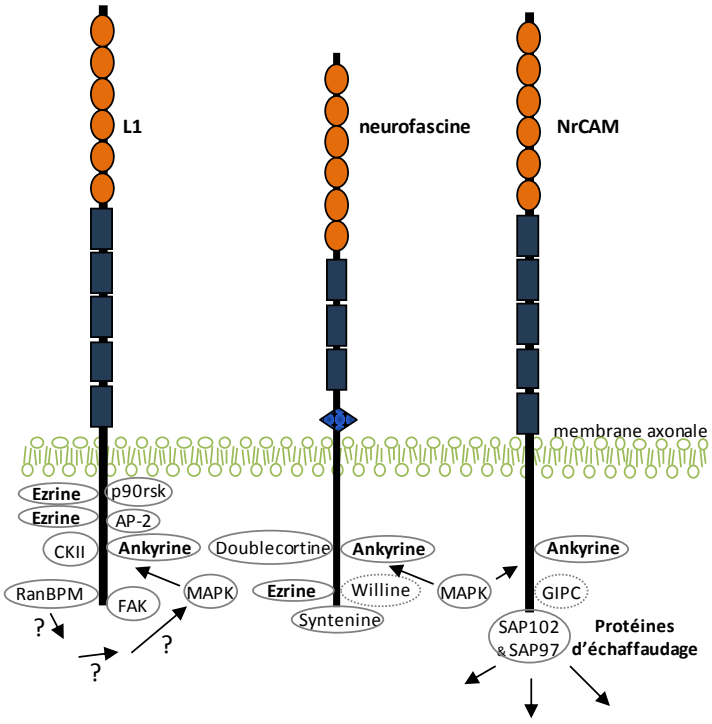


Figure 35 | Interactions connues du domaine cytoplasmique des protéines L1CAM, neurofascine et NrCAM avec diverses protéines intracellulaires. Les domaines immunoglobulines des IgCAMs sont en orange, les domaines fibronectines sont en représentés par des rectangles bleus, la neurofascine 186 possède un domaine mucine représenté par un losange bleu (Adapté de Herron et al., 2009).

Plusieurs études décrivent la dynamique et le rôle du complexe moléculaire « géant » comprenant L1CAM, l'ankyrine B et le cytosquelette d'actine F au cône de croissance. Deux études concomitantes proposent des modèles spécifiques de régulation de l'initiation neuritique (Nishimura et al., 2003a) et de la croissance neuritique (Gil et al., 2003) par la dynamique du complexe L1CAM/ankyrine B/actine F.

Une première étude montre que l'interaction entre L1CAM et l'ankyrine B est cruciale pour l'initiation neuritique dépendante de L1CAM (Nishimura et al., 2003a) (Figure 36). Lorsque L1CAM interagit avec un substrat mobile, ici une bille recouverte de protéines L1CAM permettant des interactions homophiliques, il y a interaction de L1CAM avec l'ankyrine B qui lie ce complexe d'adhérence au flux rétrograde d'actine. La bille va donc être transportée de manière rétrograde (Figure 36). Lorsque le substrat recouvert de protéines L1CAM est immobile, le complexe ankyrine B/L1CAM va être maintenu à l'état stationnaire par rapport au substrat. Les auteurs proposent que l'interaction de ce complexe immobile avec le flux rétrograde d'actine génère une force de traction qui va entraîner la formation d'une protrusion en tirant le substrat immobile vers l'arrière par ce flux rétrograde d'actine (Figure 36).

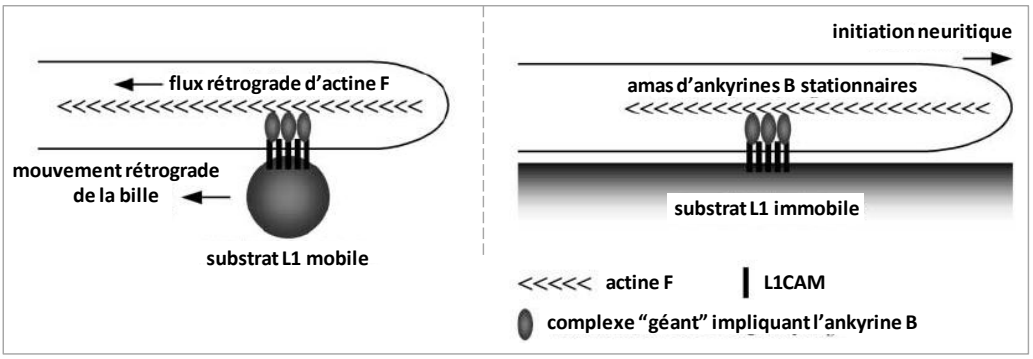


Figure 36 | Modèle de fonction du complexe L1CAM/ankyrine B/actine F dans l'initiation neuritique. Lorsque L1CAM est couplée à un substrat mobile, L1CAM suit le flux rétrograde d'actine F *via* son interaction avec l'ankyrine B. Lorsque que L1CAM est couplée à un substrat immobile, le complexe L1CAM/ankyrine B est stationnaire et génère une force de traction, due au mouvement rétrograde d'actine F, qui va permettre la formation d'une protrusion (Adapté de Nishimura et al., 2003a).

Une deuxième étude montre que l'interaction de L1CAM avec l'ankyrine B inhibe la croissance neuritique (Gil et al., 2003) (Figure 37). L1CAM présente différents types de comportements à la membrane, dont un mouvement rétrograde lorsqu'elle n'interagit pas avec l'ankyrine B et un comportement stationnaire lorsqu'elle interagit avec l'ankyrine B et le cytosquelette cortical (Figure 37). Les auteurs proposent que lorsque L1CAM n'interagit pas avec l'ankyrine B, la molécule suit le flux rétrograde d'actine, certainement par des interactions avec d'autres protéines adaptatrices comme les ERMs, ce qui exerce une force de traction qui favorise la croissance neuritique. Lorsque L1CAM interagit avec l'ankyrine, L1CAM adopte un comportement stationnaire à la surface cellulaire, ce qui induit une force restrictive qui inhibe la croissance neuritique.

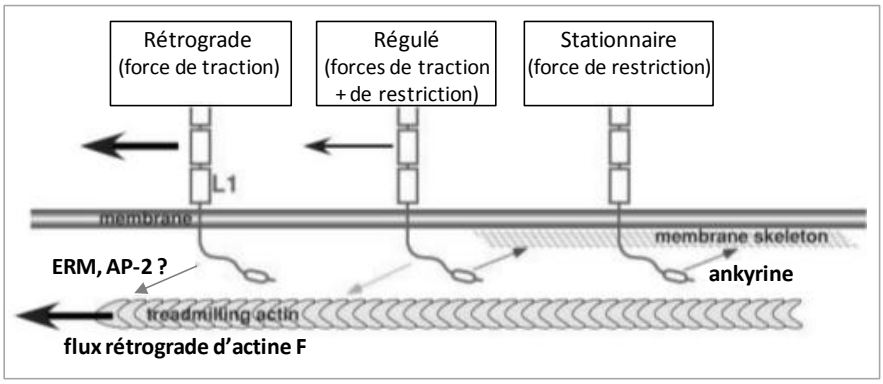


Figure 37 | Modèle de fonction du complexe L1CAM/ankyrine B/actine F dans la croissance neuritique. L1CAM présente différents types de comportements à la membrane, dont un mouvement rétrograde lorsqu'elle n'interagit pas avec l'ankyrine B et un comportement stationnaire lorsqu'elle interagit avec l'ankyrine B et le cytosquelette cortical (membrane skeleton). L'interaction de L1CAM avec l'ankyrine inhibe la croissance neuritique (Adapté de Gil et al., 2003)**.**

La croissance neuritique dépendante de L1CAM est accompagnée d'une régulation fine de la **localisation de L1CAM à la membrane** par des processus d'endocytose et de recyclage. Ainsi, le domaine périphérique du cône présente une densité plus importante de protéines L1CAM à la membrane que la région centrale du cône (Kamiguchi and Yoshihara, 2001). Les protéines L1CAM présentes à la membrane migrent de manière rétrograde de la périphérie à la région centrale du cône où elles sont endocytées (Figure 38). Une étude propose que les puits recouverts de clathrine sont déjà présents dans le domaine périphérique du cône de croissance et migrent vers la région centrale grâce au flux rétrograde d'actine F, où la dynamine permettrait la formation des vésicules d'endocytose (Tojima et al., 2010). Le couplage des puits recouverts de clathrine à l'actine F pourrait jouer un rôle essentiel dans la séquestration de L1CAM dans le domaine central du cône. L'endocytose de L1CAM est stimulée par la déphosphorylation du résidu tyrosine de son domaine cytoplasmique, inhibant son interaction avec l'ankyrine (Schaefer et al., 2002). Les endosomes contenant L1CAM sont ensuite transportés vers la périphérie du cône le long des microtubules par la protéine motrice **KIF4** (Peretti et al., 2000), et L1CAM est recyclée au front de migration du cône de croissance après fusion de la vésicule avec la membrane plasmique (Kamiguchi and Lemmon, 2000a) grâce à la protéine **VAMP7** (Alberts et al., 2003; Alberts et al., 2006) (Figure 38).

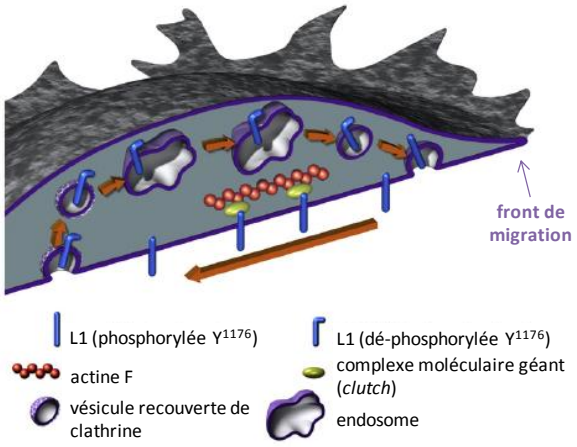


Figure 38 | Trafic de la molécule d'adhésion L1CAM. Vue d'un cône de croissance coupé de manière longitudinale. Le flux rétrograde d'actine filamenteuse (F) peut « tirer » les molécules L1CAM à la surface vers le domaine central du cône grâce à l'engagement dans les complexes moléculaires géants. L1CAM est ensuite dé-phosphorylée sur la tyrosine du motif d'interaction avec l'ankyrine (SKIGQY), ce qui conduit à son internalisation *via* des vésicules recouvertes de clathrine. L1CAM internalisée est transportée dans le domaine périphérique du cône dans les endosomes et ré-insérée à la membrane (recyclage) (Adapté de Kamiguchi and Lemmon, 2000a).

4. Molécules de guidage axonal, récepteurs et co-récepteurs associés

Les molécules de guidage axonal permettent de diriger la croissance de l'axone vers sa région-cible. Elles sont sécrétées/exprimées par les tissus environnant l'axone en extension. A chaque « point de décision », le cône de croissance rencontre des molécules de guidage dans son environnement extracellulaire, entraînant des réponses spécifiques et contrôlant son orientation précise (Dickson, 2001; Yu and Bargmann, 2001). Plusieurs familles de molécules de guidage et de récepteurs ont été identifiées :

- les **sémaphorines** et leurs récepteurs **plexines** et **neuropilines** (Pasterkamp and Kolodkin, 2003) ;
- les **nétrines** et leurs récepteurs **DCC** (pour *Deleted in Colorectal Carcinoma*) et **UNC5** (Kennedy et al., 1994) ;
- les **Slits** et leurs récepteurs **Robo** (pour *Roundabout*) (Brose and Tessier-Lavigne, 2000) ;
- les **ephrines** et leurs récepteurs **Eph** (Kullander and Klein, 2002).

D'autres familles de protéines, plus connues dans la spécification des territoires au cours du développement du tube neural, ont également été impliquées dans le guidage axonal, comme **Shh** (pour *Sonic hedgehog*) (Charron et al., 2003), les protéines **BMPs** (pour *Bone Morphogenetic Proteins*) (Butler and Dodd, 2003) et les protéines **Wnt** (pour *Wingless-type*) (Lyuksyutova et al., 2003; Yoshikawa et al., 2003).

a) Mécanismes généraux de réponse aux molécules de guidage axonal

Les changements d'orientation du cône de croissance en réponse à une molécule de guidage nécessitent l'activation de voies de signalisation dans le cône de croissance qui conduisent à des **réarrangements du cytosquelette**. Ces voies de signalisation impliquent les **petites GTPases** décrites précédemment. Une molécule de guidage répulsive va induire la dépolymérisation du cytosquelette d'actine et la collapse du cône de croissance, alors qu'une molécule de guidage attractive favorisera la polymérisation du cytosquelette dans une direction spécifique (Kalil and Dent, 2005).

L'orientation du cône de croissance repose également sur la régulation de la **balance endocytose/exocytose** au cône de croissance, permettant l'enlèvement local de membrane plasmique ou la formation de protrusion (Tojima et al., 2011). Un signal attractif va stimuler l'ajout asymétrique de membrane (exocytose) du côté de ce signal, au front de migration du cône (Tojima et al., 2007). Un signal répulsif va stimuler les voies d'endocytose asymétriques du côté de ce signal (Hines et al., 2010; Kolpak et al., 2009; Tojima et al., 2010). Ainsi, le cône tourne vers

le côté où l'endocytose est faible et/ou vers le côté où l'exocytose est élevée (Itofusa and Kamiguchi, 2011) (Figure 39).

Une étude a montré que les processus de **macropinocytose** étaient nécessaire à la réponse du cône de croissance à des molécules de guidage répulsives, comme Sonic hedgehog ou l'ephrine A2 (Kolpak et al., 2009). Ces processus sont indépendants de la clathrine mais dépendent de la dynamine, de la myosine II et de l'activité des protéines GTPases Rho. L'inhibition de la macropinocytose empêche la réponse de collapse et le changement de direction de l'axone en présence de ces molécules de guidage répulsives. A ce jour, l'implication d'autres molécules de guidage répulsives dans les processus de macropinocytose n'est pas documentée. Cependant, la macropinocytose permet l'enlèvement rapide de grandes quantités de membrane et pourrait de fait être importante pour les réponses de collapse des cônes de croissance de manière plus générale.

Jurney et collaborateurs (2002) soulignent le **découplage entre endocytose et dépolymérisation de l'actine F** lors de la réponse de collapse des cônes de croissance induite par l'ephrine A2 et la Séma3A. La petite GTPase Rac1 est impliquée dans l'endocytose en réponse aux molécules de guidage ephrine A2 et Séma3A. L'ephrine A2 et la Séma3A induisent une inhibition transitoire de l'activité de Rac1, conduisant à l'arrêt de sa fonction dans la polymérisation de l'actine F. Puis Rac1 est activée de nouveau et assure l'endocytose de la membrane plasmique et les réorganisations de l'actine F requises pour la réponse de collapse du cône de croissance. La dépolymérisation de l'actine F est quant à elle indépendante de l'activité de Rac1 (Jurney et al., 2002).

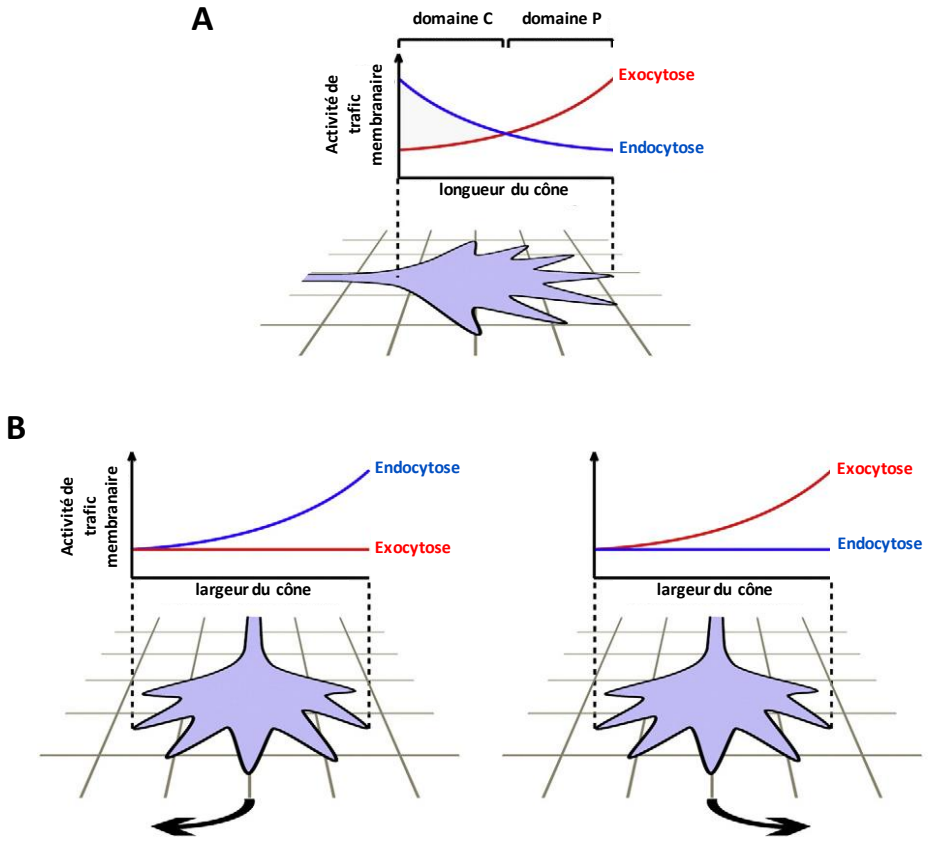


Figure 39 | Régulation spatiale de l'endocytose et de l'exocytose dans le cône de croissance en migration. ***A***, L'élongation de l'axone nécessite un trafic membranaire polarisé le long de l'axe longitudinal du cône de croissance. Le domaine central (C) du cône est un site actif d'endocytose, permettant la formation d'un gradient d'activité d'endocytose de l'arrière du cône au front de migration. Le domaine périphérique (P) est un site actif pour l'exocytose de certaines vésicules. ***B***, L'endocytose et l'exocytose asymétriques sont essentielles aux réponses du cône de croissance à des molécules répulsives et attractives respectivement. Le cône tourne vers le côté où l'endocytose est faible (à droite) et/ou vers le côté ou l'exocytose est élevée (à gauche) (Adapté de Itofusa and Kamiguchi, 2011).

L'endocytose permettrait en outre de réguler la quantité de récepteurs de guidage axonal à la membrane. La sensibilité d'un cône de croissance à une molécule de guidage axonal donnée dépend directement de la quantité de récepteurs à la membrane et de leur état d'activation. L'endocytose serait donc particulièrement importante pour permettre aux cônes de croissance de s'adapter à des concentrations diverses de molécules de guidage et en conséquence pour réguler leur sensibilité à ces molécules (Piper et al., 2005).

Dans leur étude, Piper et collaborateurs proposent un modèle où la désensibilisation et la re-sensibilisation des cônes de croissance pourraient leur permettre de naviguer à travers des gradients de molécules de guidage. La réponse de collapse des cônes de croissance de neurones de moelle épinière de Xénope en culture exposés à une forte concentration de sémaphorine 3A (Séma3A) pendant 10 minutes est diminuée si les neurones ont été pré-incubés avec une faible

concentration de Séma3A pendant 1 à 2 minute(s). Cette observation suggère que les cônes de croissance ont été désensibilisés à la Séma3A lors du pré-traitement. Les auteurs observent le même résultat pour la réponse à la nétrine 1. Lorsque le pré-traitement est plus long (3 à 5 minutes), la réponse à une forte concentration de Séma3A ou de nétrine 1 se rétablit, suggérant une re-sensibilisation des cônes de croissance à ces molécules de guidage. La désensibilisation des cônes de croissance est bloquée par l'incubation avec un inhibiteur de l'endocytose stimulée par les récepteurs, le PAO (pour *phenylarsine oxide*) ou avec un inhibiteur compétitif de la transglutaminase, une enzyme essentielle à la formation des vésicules recouvertes de clathrine, lors du pré-traitement avec la Séma3A ou la nétrine 1. Ces résultats suggèrent que la désensibilisation des cônes de croissance repose sur l'endocytose dépendante de la clathrine. La re-sensibilisation, plus lente, serait quant à elle dépendante de la synthèse protéique et du recyclage des endosomes (Piper et al., 2005). L'endocytose serait donc un **processus adaptatif** permettant de réinitialiser la sensibilité du cône de croissance aux molécules répulsives.

b) Mécanismes spécifiques de réponse aux sémaphorines

Parmi les sémaphorines de classe 3, la Séma3A est la plus étudiée. La Séma3A est une molécule sécrétée qui a généralement une action répulsive sur les cônes de croissance. Son récepteur, la neuropiline 1, interagit avec le co-récepteur plexine A. La neuropiline est une molécule transmembranaire présentant un domaine cytoplasmique très court, dont la fonction est peu comprise dans les mécanismes de guidage axonal. La plexine A permet la transduction du signal, notamment par l'interaction de son domaine SP avec les petites GTPases RhoD et Rnd1 (Huber et al., 2003) (Figure 40). Ces voies de signalisation conduisent à l'activation du facteur de dépolymérisation de l'actine, la cofiline, et à la collapse du cône de croissance.

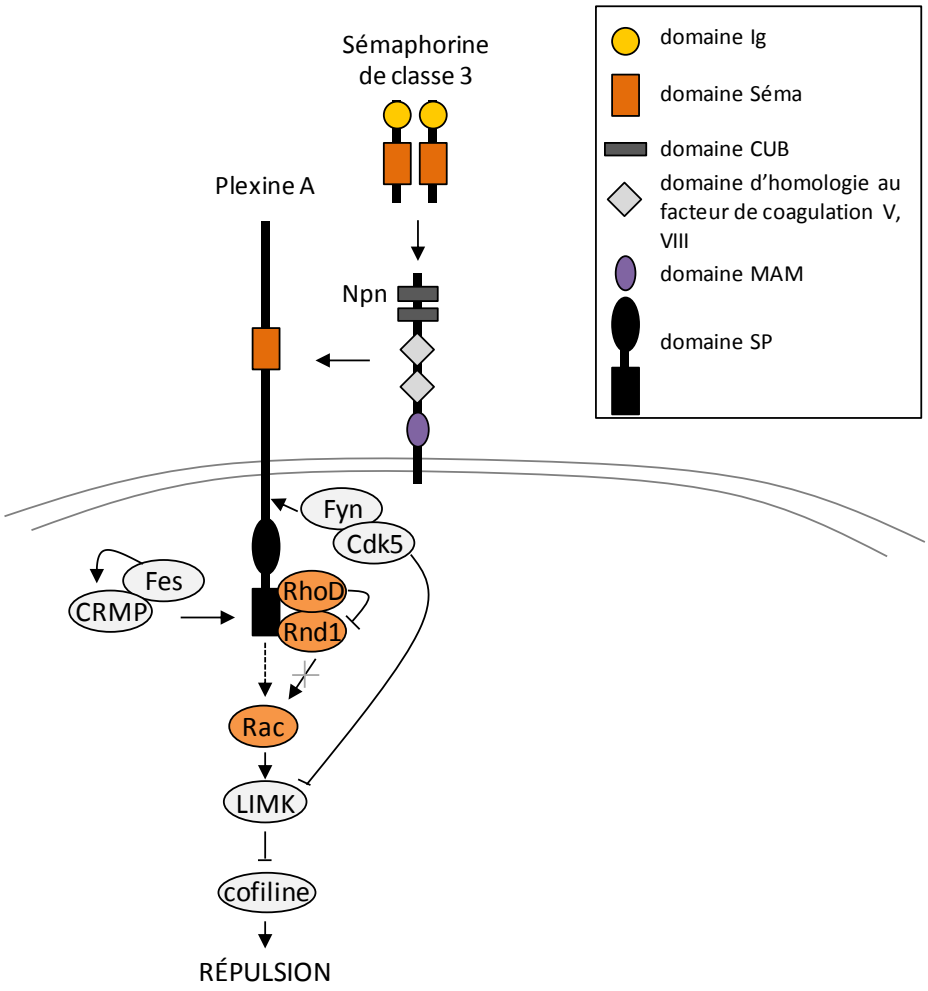


Figure 40 | Schéma simplifié de la réponse aux sémaphorines de classe 3. Les sémaphorines sécrétées de classe 3 interagissent avec les neuropilines (Npn). Les neuropilines interagissent avec la plexine A qui permet la transduction du signal, aboutissant à l'activation de la cofiline, un facteur de dépolymérisation de l'actine F. (Adapté de Huber et al., 2003).

Les molécules d'adhésion L1CAM et TAG-1, en plus de leurs propriétés adhésives, participent à la réponse à la Séma3A. Elles interagissent avec la neuropiline 1 pour moduler la réponse de certains axones à la Séma3A. Ainsi, les neurones corticaux de souris invalidées pour l'expression de L1CAM ne répondent plus à la Séma3A (Castellani et al., 2000; Castellani et al., 2004). L'interaction de L1CAM avec la neuropiline 1 (Npn1) et l'interaction de TAG-1 à L1CAM stimulent l'endocytose du complexe plexine A/Npn1 en réponse à la Séma3A (Castellani et al., 2004). Dans ce contexte, l'endocytose du complexe en réponse à la Séma3A va augmenter la réponse des cônes de croissance et induire une forte répulsion (Bashaw and Klein, 2010) (Figure 41). L'hypothèse est que la voie MAPK est stimulée par l'internalisation de L1CAM, qui co-localise avec ERK dans les vésicules d'endocytose (Schaefer et al., 1999; Schmid et al., 2000). La voie MAPK induit la collapse des cônes de croissance en réponse à la Séma3A (Campbell and Holt, 2001).

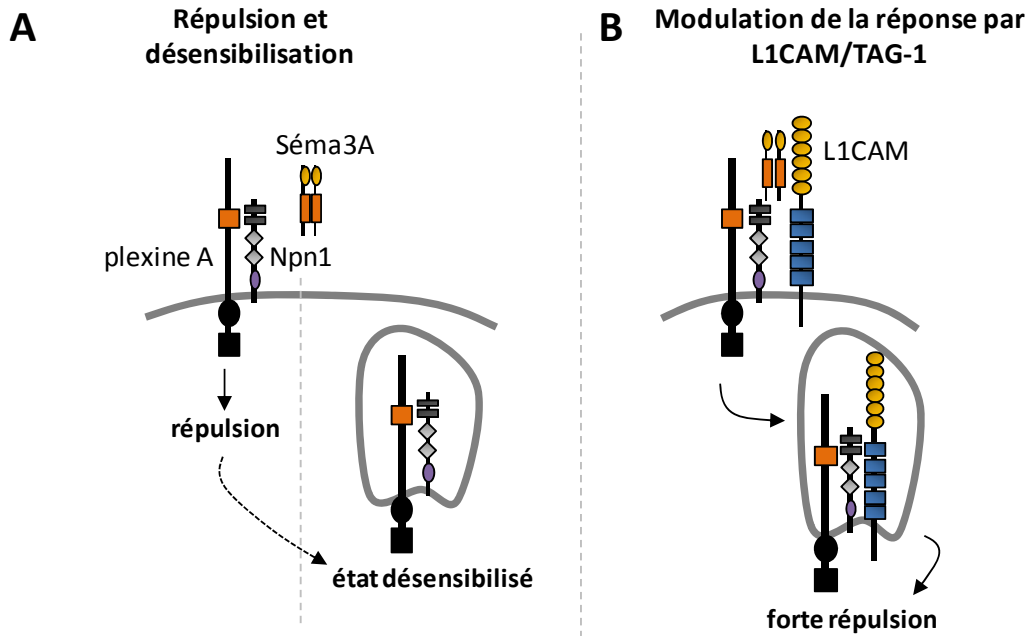


Figure 41 | Résumé de la régulation de la réponse à la Séma3A par l'endocytose. L'endocytose permet au cône de croissance de s'adapter aux molécules de guidage. ***A***, Les cônes de croissance collapsent suite à l'interaction de la Séma3A avec Npn1 et plexine A (répulsion). Une exposition à une faible dose de Séma3A désensibilise les cône de croissance, grâce à l'endocytose du récepteur (état désensibilisé). ***B***, La réponse de certains axones à la Séma3A est modulée par L1CAM. L'interaction de L1CAM à Npn1 facilite l'internalisation des récepteurs à la Séma3A, et augmentent la réponse des cônes de croissance à la Séma3A (forte répulsion) (Adapté de Bashaw and Klein, 2010).

Mintz et collaborateurs (2008) proposent que l'internalisation de L1CAM serait contrôlée par les **protéines ERMs**. Les auteurs ont étudié l'implication des protéines ERMs dans la réponse des cônes de croissance de neurones corticaux à la Séma3A, en surexprimant soit l'ezrine constitutivement active (EzT567D) soit l'ezrine sans son domaine C-terminal d'interaction avec l'actine (N-Ez). La surexpression de ces mutants dans les neurones corticaux entraîne des défauts de guidage *in vivo*, les axones n'étant plus repoussés par la zone marginale. La réponse de collapse induite par la Séma3A est totalement abolie lors de la surexpression des deux mutants ezrine, ce qui n'est pas le cas lors de la surexpression de la forme sauvage de l'ezrine. Ces résultats montrent que l'ezrine joue un rôle dans la réponse des axones à la Séma3A. Les neurones exprimant les formes mutées de l'ezrine EzT567D ou N-Ez n'internalisent plus L1CAM. Lorsque les cônes de croissance expriment EzT567D ou N-Ez, le niveau de la Npn1 à la surface reste stable en réponse à la Séma3A (Mintz et al., 2008).

Les **sémaphorines 3B et 3F** ont, quant à elles, comme récepteur la **neuropiline 2** (Npn2) (Giger et al., 2000) et comme co-récepteur la plexine A4 (Suto et al., 2005). La Npn2 interagit spécifiquement avec la molécule d'adhésion **NrCAM**. Cette interaction implique les domaines

extracellulaires des deux protéines (Falk et al., 2005). NrCAM n'empêche pas l'interaction de la Npn2 avec les sémaphorines ou avec la plexine A, et participe à la réponse aux sémaphorines 3B et 3F (Falk et al., 2005). Les mécanismes restent à ce jour peu connus mais NrCAM pourrait dans ce cas jouer un rôle similaire à ceux montrés pour L1CAM et TAG-1 dans la réponse à la Séma3A.

c) Mécanismes spécifiques de réponse aux Eph/ephrines

Les récepteurs Eph font partie de la famille des **récepteurs tyrosine-kinases** et sont divisés en deux sous-familles, les récepteurs de type A (9 membres chez les Mammifères, EphA1-EphA8 et EphA10) et les récepteurs de type B (5 membres, EphB1-EphB4 et EphB6). Les récepteurs Eph ont une structure globale commune mais diffèrent dans leur séquence en acides-aminés, notamment dans leur domaine d'interaction avec leurs ligands, les ephrines. Les ephrines sont des protéines transmembranaires divisées en deux sous-familles. La classe A (ephrine A1-A5) est ancrée à la membrane par une ancre GPI alors que la classe B (ephrine B1-B3) possède un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique sans activité catalytique endogène. Les Eph de type A interagissent avec la plupart des ligands de type A et les Eph de type B avec les ligands de type B. Quelques exceptions existent, en particulier pour EphA4, qui interagit et avec les ephrines A et avec les ephrines B (Pasquale, 2005).

Lors de l'interaction EphB-ephrine B, une réponse cellulaire pourra être observée dans la cellule exprimant EphB par des mécanismes de signalisation dite « directe » et dans celle exprimant ephrine B par des mécanismes de signalisation dite « inverse » (Egea and Klein, 2007) (Figure 42). Bien que ne possédant pas de domaine intracellulaire, l'ephrine A induirait également une signalisation inverse en réponse à l'EphA, *via* son interaction avec des co-récepteurs, comme le récepteur au BDNF, TrkB (Xu and Henkemeyer, 2012).

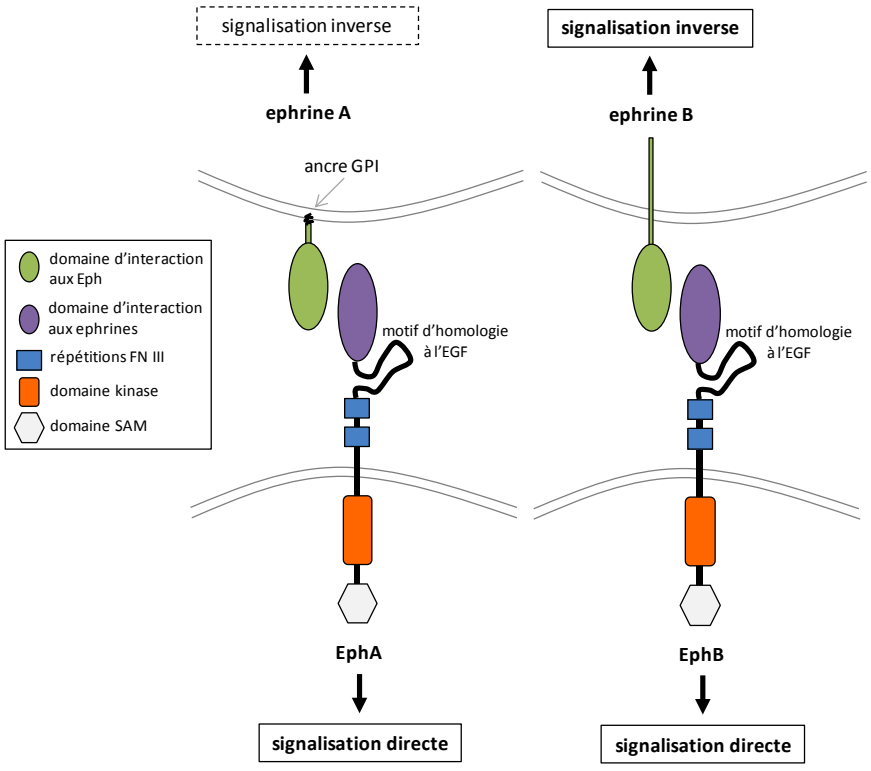


Figure 42 | Schéma général des interactions entre les récepteurs Eph et les ephrines. FN III, fibronectine de type 3 ; SAM, motif α stérile (Adapté de Egea and Klein, 2007).

L'interaction Eph-ephrine n'est pas génératrice d'adhésion entre les cellules mais provoque une réaction de **répulsion**. Des mécanismes vont donc permettre le détachement des cellules en aval de la voie de signalisation Eph-ephrine. La répulsion induite par les ephrines A requiert le clivage de l'ectodomaine de l'ephrine A par ADAM10 (pour *A-Disintegrin-And-Metalloprotease*) (Janes et al., 2005). L'ephrine B pourrait quant à elle être clivée dans son domaine transmembranaire par la préséniline (Georgakopoulos et al., 2006). Des expériences de cultures cellulaires ont cependant montré que l'interaction de cellules exprimant les récepteurs EphB avec des cellules exprimant les ephrines B entraine la formation rapide de vésicules intracellulaires contenant les complexes EphB-ephrine B dans les deux populations de cellules (Figure 43). Ces complexes d'endocytose contiennent les protéines totales, suggérant que les partenaires sont « trans-endocytés » d'une cellule à la cellule opposée (Marston et al., 2003; Zimmer et al., 2003). Dans ce contexte, l'endocytose du complexe EphB/ephrine B ne semble pas nécessaire à l'activation des voies de signalisation et à la collapse des cônes de croissance mais serait importante pour le détachement des deux cellules, ayant lieu *après* la réponse de collapse (Zimmer et al., 2003). Les voies de signalisation intracellulaires par lesquelles les complexes Eph-ephrines sont « trans-endocytés » sont mal caractérisées à ce jour.

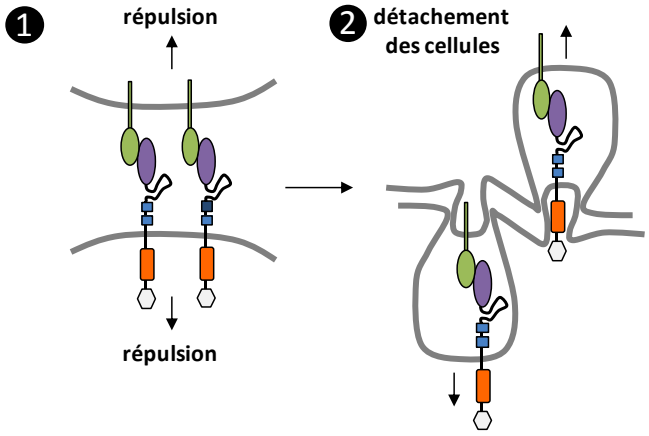


Figure 43 | Interaction ephrine B-EphB, répulsion, modèle de trans-endocytose. (1) L'interaction EphB-ephrine B provoque la répulsion entre les cellules. **(2)** Pour achever le processus de répulsion, les cellules se détachent par un mécanisme de « trans-endocytose » (Adapté de Bashaw and Klein, 2010).

Les **voies de signalisation directes** des Ephs ont été largement décrites. Elles font intervenir de nombreuses protéines qui vont participer à la régulation de la morphologie et la dynamique des cellules *via* des réorganisations du cytosquelette (Huot, 2004). Egea et Klein (2007) décrivent un modèle de signalisation des Ephs impliquant les petites GTPases de la famille Rho au cône de croissance (Figure 44). Lorsque les Ephs ne sont pas liés aux ephrines, ils recrutent l'ephexine à la membrane qui active les petites GTPases Cdc42, Rac et RhoA ce qui stimule la croissance axonale. L'agrégation des Ephs induite par leur interaction avec les ephrines permet d'augmenter leur phosphorylation sur des résidus tyrosines et stimule leur activité tyrosine kinase. La voie de signalisation est ainsi modifiée, privilégiant l'activation de RhoA qui stimule la dépolymérisation de l'actine F et la contraction des filaments d'actine, ce qui induit la collapse du cône de croissance. Les protéines Vav sont également recrutées et activées par les Ephs activés, elles promeuvent la polymérisation de l'actine dépendante de Rac, nécessaire à la formation des vésicules d'endocytose (Figure 44).

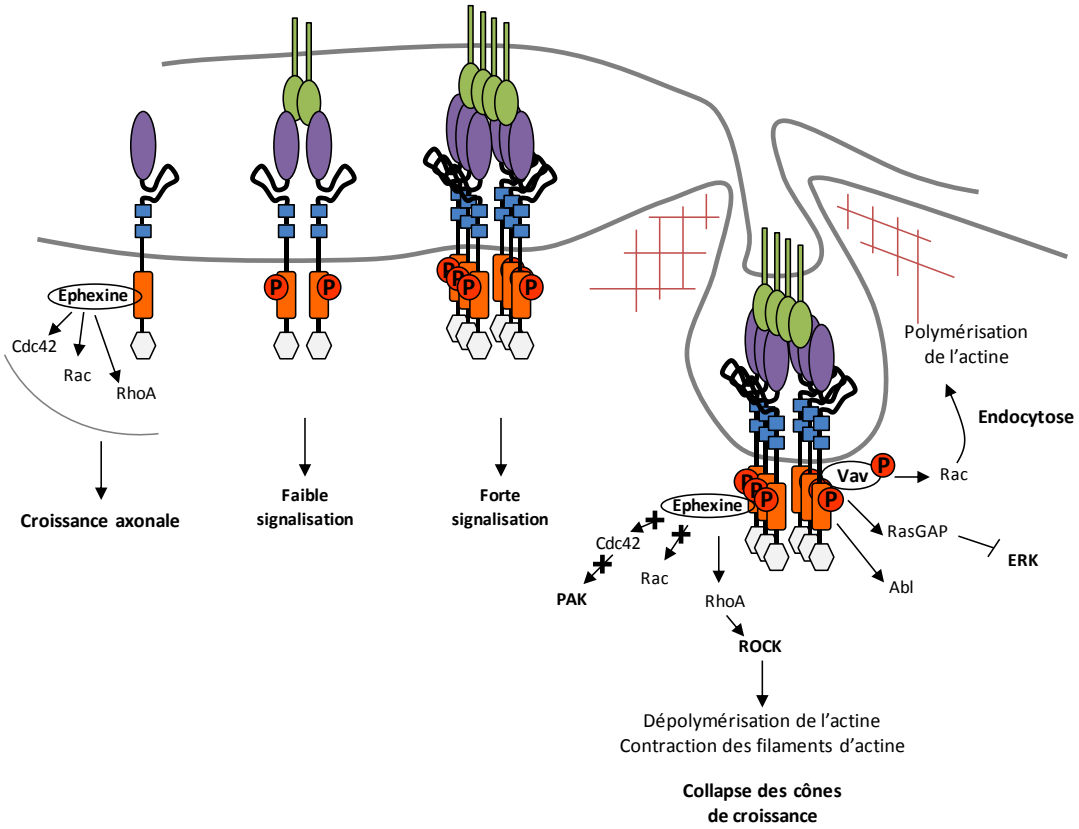


Figure 44 | Voie de signalisation directe des Ephs. Lorsque les Ephs n'interagissent pas avec les ephrines, ils recrutent l'ephexine qui active Cdc42, Rac et RhoA, ce qui promeut la croissance axonale. L'interaction avec les ephrines induit l'agrégation des Ephs à la membrane, ce qui augmente leur niveau de phosphorylation (P) et donc leur activité. L'ephexine ne stimule plus que RhoA dans ces conditions, ce qui aboutit à la dépolymérisation et à la contraction des filaments d'actine, et à la collapse du cône de croissance. Les Ephs activés recrutent et activent la protéine Vav, qui va activer Rac, ce qui stimule la polymérisation de l'actine et la formation des vésicules d'endocytose (Adapté de Egea and Klein, 2007 ; Huot, 2004).

Les **voies de signalisation inverses** des ephrines B sont importantes pour diverses événements morphogénétiques, dont la fusion de la ligne médiane (Dravis et al., 2004), le guidage axonal (Pasquale, 2005; Cowan et al., 2004; Kayser et al., 2006), la synaptogénèse (Kayser et al., 2006) et la plasticité (Armstrong et al., 2006). Le domaine intracellulaire de EphB n'est pas nécessaire à la réponse induite par l'activation des ephrines B, le domaine extracellulaire de EphB2 étant suffisant pour générer la collapse des cônes de croissance exprimant l'ephrine B2 (Mann et al., 2003). Les ephrines B sont activées par leur regroupement à la membrane qui promeut le recrutement et l'activation des kinases de la famille Src qui vont à leur tour phosphoryler des résidus tyrosines spécifiques du domaine cytoplasmique des ephrines B (Palmer et al., 2002) (Figure 45). L'ephrine B phosphorylée sert de site d'ancrage pour les protéines adaptatrices contenant un domaine SH2, comme Grb4, qui active ensuite des voies de signalisation conduisant à l'activation de la petite GTPase Rac qui va inhiber la polymérisation de l'actine, et à l'activation de PAK qui va réguler les adhésions focales (Cowan and Henkemeyer, 2001; Palmer et al., 2002; Xu and Henkemeyer, 2009). Ces voies de signalisation vont conduire à la collapse du cône de croissance. Par ailleurs les ephrines B contiennent un domaine d'interaction PDZ, permettant le recrutement d'autres protéines possédant un domaine PDZ qui pourraient également participer à la signalisation inverse (Palmer et al., 2002) (Figure 45).

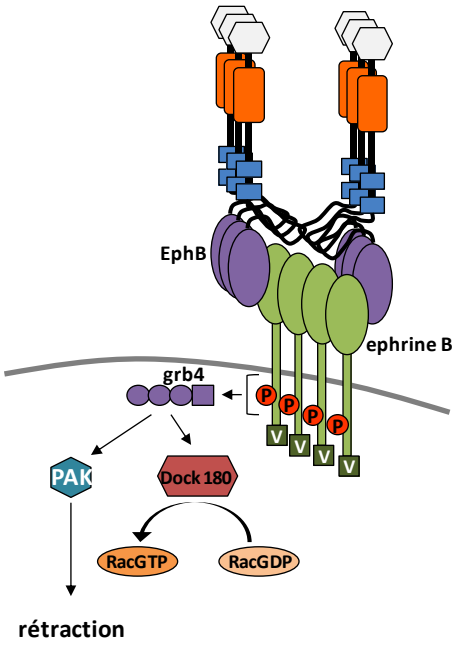


Figure 45 | Voie de signalisation inverse des ephrines B. Lors de l'interaction avec l'EphB, les molécules d'ephrines B s'agrègent et sont phosphorylées. L'ephrine B phosphorylée interagit avec la protéine adaptatrice Grb4 *via* son domaine SH2. Grb4 permet le recrutement de Dock180 et PAK *via* son domaine SH3, ce qui augmente l'activité de Rac et conduit à la rétraction du cône de croissance. De plus, le domaine PDZ carboxy-terminal (V) assure d'autres interactions (Adapté de Xu and Henkemeyer, 2012).

D. Souris mutées et anomalies de la commissure antérieure

1. Protéines impliquées dans le développement de la commissure antérieure

De nombreuses protéines ont été impliquées dans le développement de la commissure antérieure grâce à l'étude de souris mutées (Lindwall et al., 2007). Parmi ces protéines, sont retrouvés des régulateurs du cytosquelette (actine et microtubules), des protéines d'adhésion (contacts avec la matrice extracellulaire, jonctions adhérentes, adhésions focales), des facteurs de croissance, et des molécules de guidage axonal.

Ces protéines, leur fonction et les défauts de fibres observés chez les souris mutées sont répertoriés dans le tableau 2 (p. 79-86). Les défauts de la commissure antérieure sont illustrés dans la figure 49 (p. 78).

Les anomalies observées chez les souris mutées pour les molécules de guidage et les protéines CAMs associées d'intérêt pour mon travail de thèse sont présentées ci-dessous.

2. Souris invalidées pour l'expression des sémaphorines de classe 3, de leurs récepteurs et co-récepteurs

a) Sémaphorines 3B et 3F, neuropiline 2 et NrCAM

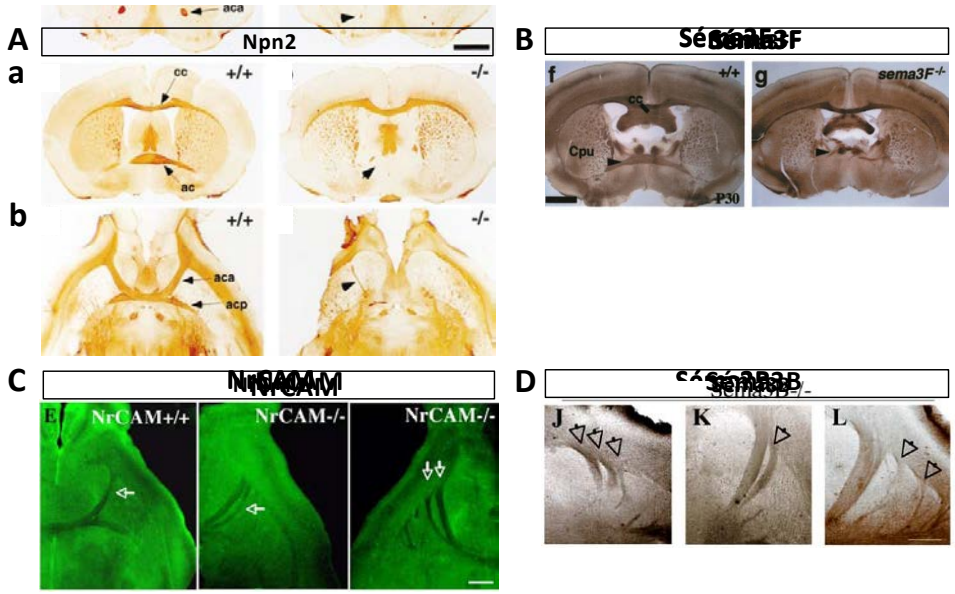
La **neuropiline 2** (Npn2), exprimée par les axones des deux branches de la commissure antérieure (CA), est le récepteur des sémaphorines 3B, 3C et 3F. Les souris mutées pour Npn2 présentent de sévères anomalies de la CA. La branche postérieure de la CA est absente et la branche antérieure fortement réduite, avec quelques fibres résiduelles dé-fasciculées (Figure 46). La taille et la morphologie du noyau olfactif antérieur ne sont pas affectées, suggérant que l'absence de CA n'est pas due à une mort cellulaire importante au cours du développement, mais plutôt à un défaut de guidage axonal. Cependant, aucun axone projetant de manière anormale vers une autre structure n'a pu être observé chez ces souris (Giger et al., 2000; Chen et al., 2000).

La **sémaphorine 3F** (Séma3F) est exprimée dans le télencéphale ventral, dans l'aire pré-optique et l'hypothalamus, et dans le striatum aux stades de développement de la CA. Sans l'action répulsive de la Séma3F sur les axones des branches antérieure et postérieure de la CA, les souris mutées pour la Séma3F présentent un phénotype au niveau de la CA très similaire à celui des souris mutées Npn2 (Figure 46). La branche postérieure de la CA est absente, la branche antérieure est sévèrement dé-fasciculée. Les axones traversant la ligne médiane sont organisés de manière chaotique en petits faisceaux de fibres (Sahay et al., 2003).

La **sémaphorine 3B** (Séma3B) est exprimée dans la zone sous-ventriculaire adjacente aux ventricules latéraux au cours du développement. La Séma3B a une action attractive sur les axones de la branche antérieure de la CA et une action répulsive sur les axones de la branche

postérieure. Les souris mutées pour la Séma3B présentent une CA élargie ventralement, dans des régions dépourvues de fibres chez les souris sauvages. Le plan dorsoventral de projection est anormal pour les deux branches de la CA. La branche antérieure de la CA est sévèrement dé-fasciculée avec de nombreuses racines qui sortent du cortex de manière latérale, formant des faisceaux supplémentaires d'axones (Falk et al., 2005) (Figure 46).

La protéine d'adhésion **NrCAM** est exprimée par les axones des deux branches de la CA et participe aux réponses des axones aux Séma3F et Séma3B, par le biais de son interaction avec Npn2. Dans des expériences de culture d'explants, l'application d'anticorps dirigés contre NrCAM ou de NrCAM-Fc soluble dans le milieu de culture empêche la répulsion des axones de la branche postérieure de la CA en réponse aux Séma3B et Séma3F. La réponse d'attraction des axones de la branche antérieure de la CA à la Séma3B est aussi inhibée par la présence d'anticorps dirigés contre NrCAM dans le milieu de culture (Falk et al., 2005). Cependant, les souris mutées pour NrCAM n'ont pas un phénotype aussi sévère au niveau de la CA que les souris mutées pour Npn2 ou Séma3F (Figure 46). La branche postérieure de la CA est peu affectée, la branche antérieure présente des fibres dé-fasciculées qui projettent dans les territoires ventraux. Des branches supplémentaires dé-fasciculées en position latérale de la branche antérieure de la CA sont retrouvées chez ces souris, phénotype similaire à celui des souris mutées pour la Séma3B (Falk et al., 2005) (Figure 46). NrCAM participe donc probablement à certaines mais pas à toutes les fonctions du complexe Séma3F/Npn2. Une autre hypothèse est que certaines de ses fonctions sont compensées chez les souris mutées pour NrCAM. La dé-fasciculation des axones de la CA, commune aux souris mutées pour NrCAM et pour Npn2, pourrait refléter l'absence d'interaction Npn2/NrCAM, sachant que ces protéines peuvent s'associer en *trans* (Falk et al., 2005).



E

mutant / defect	Nrp2	sema3F	sema3B	NrCAM
Reduced tract	+	+	-	-
Defasciculation	+	+	+	+
Dorsal shift	nd	+	-	-
Ventral shift	+	+	+	+
Lateral shift	nd	nd	+	+

Figure 46 | Anomalies de la commissure antérieure chez les souris mutées pour Npn2, Séma3F, NrCAM et Séma3B. ***A-a***, ***B***, Coupes coronales de cerveau de souris adultes sauvages (+/+) et mutées (-/-) pour Npn2 (*A*) et pour Séma3F (*B*) immunomarquées avec un anticorps anti-neurofilament. Les têtes de flèche montrent l'absence de CA (ac) chez les souris mutées. ***A-b***, ***C***, ***D***, Coupes horizontales de cerveau de souris adultes sauvages et mutées pour Npn2 immunomarquées avec un anticorps anti-neurofilament (*A*), pour NrCAM photographiées en contraste à interférences (*C*), et pour Séma3B immunomarquées avec un anticorps anti-Npn2 (*D*). Les deux branches de la CA sont visibles chez les souris sauvages. La branche antérieure (aca) est réduite chez les souris mutées pour Npn2 (tête de flèche) et la branche postérieure (acp) est absente (*A-b*). La branche antérieure de la CA est fortement défasciculée chez les souris mutées pour NrCAM (*C,* flèches) et pour Séma3B (*D*, flèches). ***E***, Tableau récapitulatif des défauts observés chez les souris mutées pour Npn2, NrCAM, Séma3F et Séma3B. cc, corps calleux ; Cpu, putamen caudé (Adapté de Giger et al., 2000 (*A*), Sahay et al., 2003 (*B*), Falk et al., 2005 (*C-E*)).

b) Plexine A4 et sémaphorine 6A

La **plexine A4** est exprimée dans le noyau olfactif antérieur et le télencéphale latéral, et interagit avec la neuropiline. Chez les souris adultes mutées pour la plexine A4, les deux branches de la CA sont absentes (Figure 47). A la naissance, les fibres de la branche antérieure de la CA sont visibles et plongent dans la partie ventrale du télencéphale au lieu de projeter vers la ligne médiane. La plexine A4 interagit avec les sémaphorines transmembranaires de classe 6, dont la sémaphorine 6A (Séma6A) (Suto et al., 2005). Les souris mutées pour Séma6A ont un phénotype au niveau de la CA ressemblant à celui des souris mutées pour la plexine A4 (Figure 47). L'hypothèse est donc que le rôle de la plexine A4 dans le développement de la CA serait de relayer la réponse à la Séma6A (Runker et al., 2011).

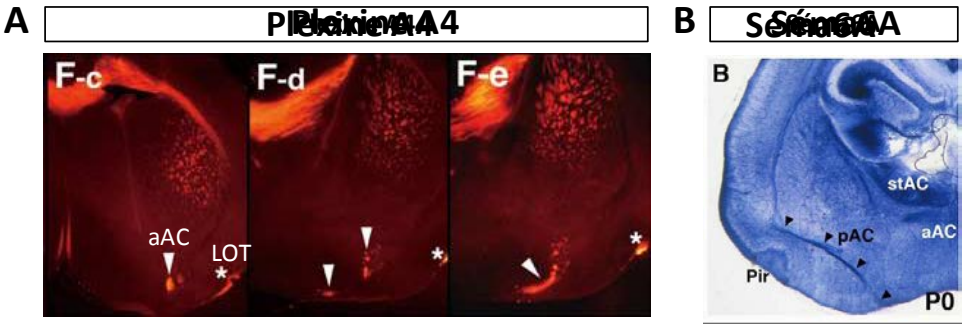


Figure 47 | Anomalies de la commissure antérieure chez les souris mutées pour plexine A4 et Séma6A. ***A, B***, Coupes coronales de cerveaux de souris nouveau-nées immunomarquées avec un anticorps anti-TAG-1 (*A*) ou marquées grâce à la phosphatase alkaline placentaire encodée par l'allèle mutant Séma6D (*B*). ***A***, Chez les souris mutées pour la plexine A4, les axones de la branche antérieure de la CA (aAC) plongent dans la partie ventrale du cerveau (têtes de flèche). Les axones du tractus olfactif latéral (LOT) sont localisés par les astérisques. ***B***, Chez les souris mutées pour la Séma6A, les axones de la branche postérieure de la CA (pAC) plongent dans la partie ventrale du cerveau (têtes de flèche). Pir, cortex piriforme ; stAC, strie terminale de la CA (Adapté de Suto et al., 2005 (*A*), Rünker et al., 2011 (*B*)).

3. Souris invalidées pour l'expression de l'ephrine B2, de EphB2 et EphA4

Le récepteur tyrosine kinase **EphB2** (ou Nuk) est exprimé dans le télencéphale ventral dans des structures voisines de la « route » empruntée par les axones de la CA, comme l'aire pré-optique et l'hypothalamus, au niveau de la ligne médiane de manière ventrale par rapport à la CA au cours du développement. Les axones de la CA, quant à eux, n'expriment pas EphB2. Les souris mutées pour EphB2 ne présentent pas d'anomalies majeures dans la branche antérieure de la CA mais présentent une forte réduction de la branche postérieure avec des axones projetant vers les régions ventrales du télencéphale (Henkemeyer et al., 1996; Ho et al., 2009) (Figure 48). Ces observations suggèrent que la répulsion des axones de la branche postérieure de la CA assurée par EphB2 est nécessaire à leur guidage vers la ligne médiane.

Les **ephrines B** interagissent avec EphB2 et sont exprimées par les axones de la CA. Cowan et collaborateurs (2004) ont généré des souris mutées chez lesquelles le domaine intracellulaire d'**ephrine B2** a été remplacé par la β galactosidase. Chez ces souris, l'ephrine B2 est bien adressée à la membrane mais la signalisation inverse nécessitant son domaine intracellulaire est abolie. Ces souris présentent des anomalies de CA fortement similaires à celles observées chez les souris mutées pour EphB2. Les axones de la branche postérieure de la CA ne traversent pas la ligne médiane et projettent vers les régions ventrales (Cowan et al., 2004) (Figure 48). Dans ce cas, l'ephrine B2 jouerait le rôle de récepteur à EphB2 et relaierait la réponse de répulsion, *via* la signalisation inverse décrite précédemment.

Le récepteur tyrosine kinase **EphA4** participe également au développement de la commissure antérieure (Dottori et al., 1998). EphA4 n'est pas exprimé dans la branche antérieure de la CA et faiblement exprimé dans la branche postérieure (Ho et al., 2009). Les cellules exprimant fortement EphA4 sont retrouvées dans la zone ventriculaire du 3ème ventricule et dans le striatum. EphA4 interagit avec les ephrines B et a une action répulsive sur les axones de la CA. Les souris mutées pour EphA4 présentent une forte réduction de la CA, dont les axones projettent dans les régions ventrales et latérales (Figure 48). Ce phénotype peut être sauvé par l'expression du récepteur EphA4 sans domaine tyrosine kinase, suggérant que la fonction d'EphA4 dans le développement de la CA est indépendante de son activité kinase (Kullander et al., 2001). Les souris mutées pour EphA4 présentent également une anomalie de ségrégation des axones des branches antérieure et postérieure de la CA, ce qui conduit à un mélange des axones des deux branches (Ho et al., 2009) (Figure 48).

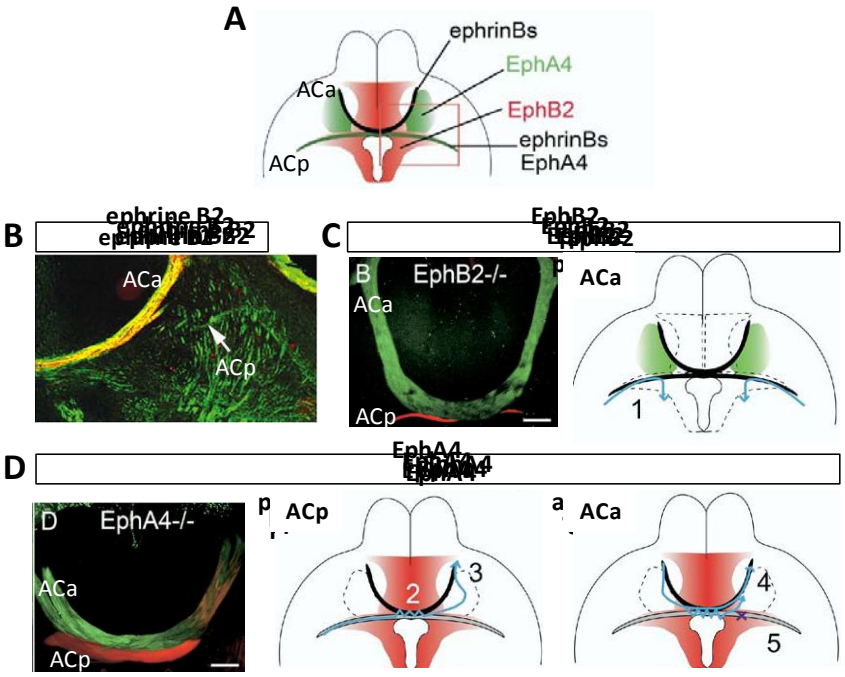


Figure 48 | Expression des ephrines B, EphB2 et EphA4, et anomalies de la commissure antérieure chez les souris mutées. ***A***, Schéma des patrons d'expression des ephrines B et de EphA4 et EphB2. ***B-D***, Coupes horizontales de cerveaux de souris adultes mutées pour l'ephrine B2 (*B*), pour EphB2 (*C*) et pour EphA4 (*D*). ***B***, Immunomarquage avec des anticorps anti-TAG-1 marquant les axones de la branche antérieure de la CA (ACa) et anti-L1 marquant les axones des deux branches de la CA. La branche postérieure de la CA (ACp) est absente chez les souris mutées pour l'ephrine B2, seuls quelques axones sont visibles et n'atteignent pas la ligne médiane (flèche). ***C, D***, Injections stéréotaxiques de traceurs fluorescents : *Emerald green* (en vert) dans le noyau olfactif antérieur pour marquer les axones de l'ACa, et DiI (en rouge) dans le cortex piriforme postérieur pour marquer les axones de l'ACp. ***C***, Les souris mutées pour EphB2 présentent une forte réduction de l'ACp. Le schéma à gauche montre que les axones de la pCA envahissent les régions ventrales et postérieures car ils ne sont plus repoussés par EphB2 (flèches bleues). ***D***, Les axones de l'ACp des souris mutées pour EphA4 ne sont plus ségrégés et se mélangent aux axones de l'ACa car ils ne sont plus repoussés par l'EphA4. De plus, l'ACa est déplacée latéralement. A gauche, schémas résumant les défauts observés au niveau de l'ACp et au niveau de l'ACa chez les souris mutées pour EphA4 (Adapté de Cowan et al., 2004 (*B*), Ho et al., (2009) (*A, C, D*)).

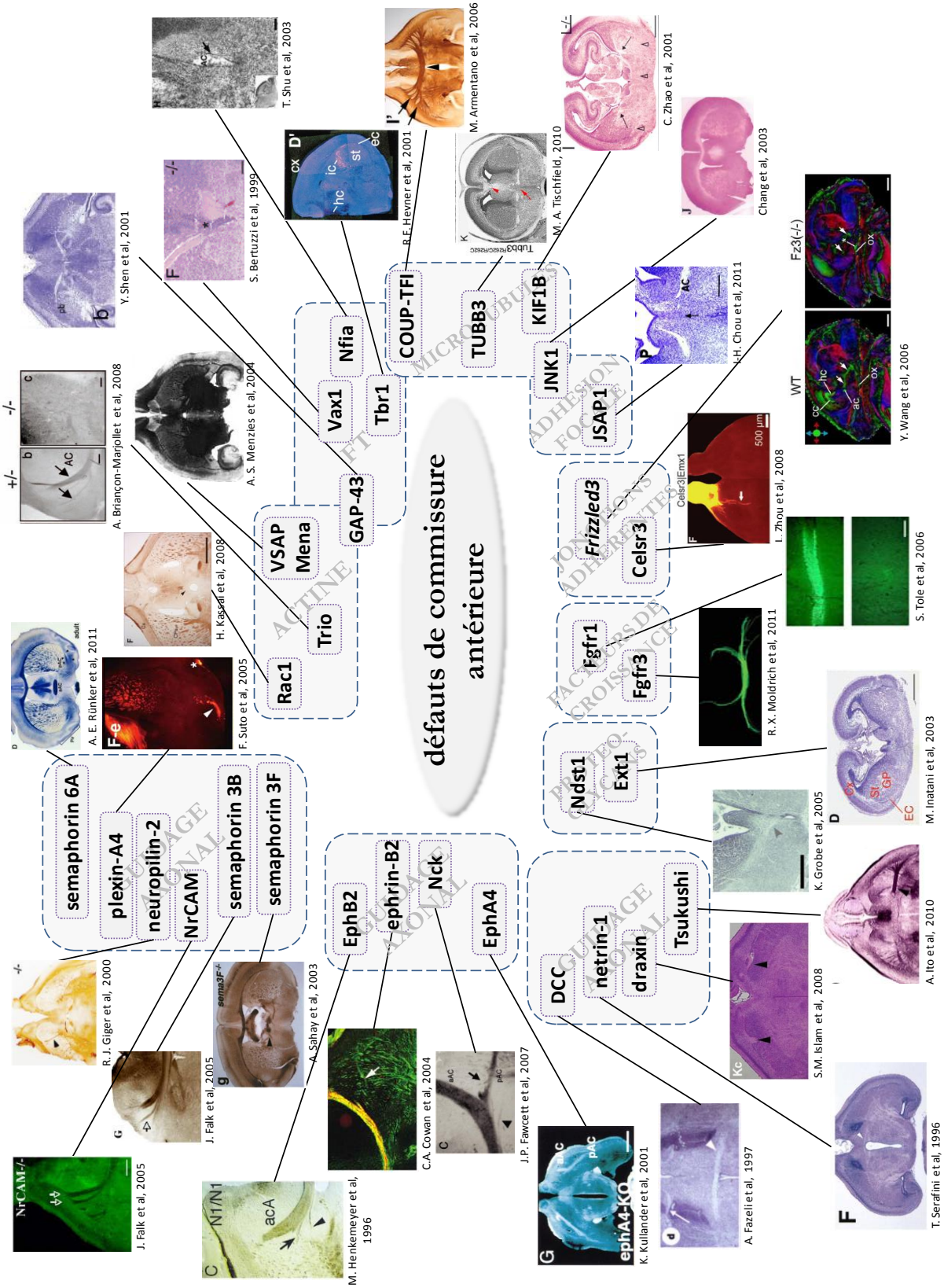


Figure 49 | Défauts de commissure antérieure décrits chez diverses souris mutées.

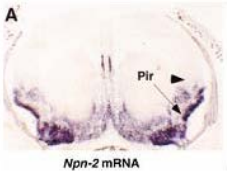
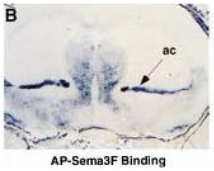
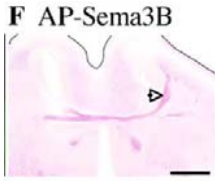
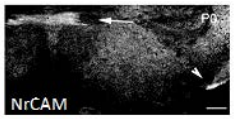
Tableau 2 | Protéines impliquées dans le développement de la commissure antérieure et défauts de fibres décrits chez les souris mutées. CA, commissure antérieure ; LOT, tractus olfactif latéral.

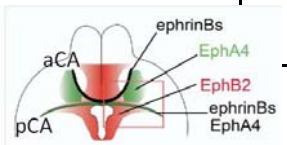
Protéines	Fonction(s)	Défauts de commissure antérieure observés chez la souris mutée	Autres faisceaux d'axones affectés chez la souris mutée
Rac1 (Kassai et al., 2008) Souris recombinantes : absence de Rac1 dans les neurones de projection du cortex à partir de E10.5 (Emx1).	cytosquelette d'actine Famille des Rho GTPases, rôle dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine. Implication dans la réponse aux molécules de guidage, par exemple à la nétrine 1, via l'adaptateur Nck1 (Li et al., 2002).	CA absente	corps calleux
Trio (Briançon-Marjollet et al., 2008)	cytosquelette d'actine *Guanine Exchange Factor* (GEF), interagit avec DCC, via l'adaptateur Nck1, et active Rac1 en réponse à la liaison de nétrine-1 à DCC. L'activation de Trio en réponse à l'interaction de la nétrine-1 avec DCC pourrait être induite par sa phosphorylation grâce à la kinase d'adhésion focale (FAK) ou la kinase de la famille Src, Fyn.	défasciculation chez les hétérozygotes, absence de la CA chez les homozygotes pour la mutation	corps calleux capsule interne axones commissuraux de la moelle épinière
Ena / VSAP (Menzies et al., 2004)	cytosquelette d'actine *Ena / Vasodilatator-stimulated phosphoprotein,* protéine régulatrice du cytosquelette d'actine, localisée aux adhésions focales, dans les lamellipodes et les filopodes ; se lie à l'actine filamenteuse et promeut la croissance de filaments très longs et sans branchement .	très peu d'axones de la CA traversant la ligne médiane présence d'axones de la CA guidés anormalement dans le lobe temporal	corps calleux commissure hippocampique (dorsale et ventrale)
GAP-43 (Shen et al., 2001)	cytosquelette d'actine *Growth-Associated Protein-43* , phosphorylation par la PKC en réponse à des molécules de guidage (ex : nétrine-1), liaison au PIP3, stabilisation du cytosquelette d'actine. Lorsque GAP-43 est phosphorylée par la PKC, elle est ségrégée dans les lamellipodes et les filopodes mobiles (Dent and Meiri, 1998) et stabilise les filaments d'actine. Au contraire, lorsque GAP-43 n'est pas phosphorylée, elle est enrichie dans les lamellipodes en rétraction ou en collapse et inhibe la polymérisation de l'actine filamenteuse (He et al., 1997). La phosphorylation de GAP-43 peut être stimulée par les protéines d'adhérence de la superfamille IgCAMs, comme L1CAM, et par des facteurs de croissance comme le FGF basique (bFGF) (Meiri et al., 1998 ; Tejero-Diez et al., 2000). GAP-43 est également décrite comme facteur de transcription, et stimule notamment la transcription de la GFAP.	aCA : absente pCA : réduite en taille, quelques axones visibles mais ne traversant pas la ligne médiane.	corps calleux commissure hippocampique

Protéines	Fonction(s)	Défauts de commissure antérieure observés chez la souris mutée	Autres faisceaux d'axones affectés chez la souris mutée
COUP-TF1 (Armentano et al., 2006)	microtubules *Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor 1,* facteur de transcription, récepteur nucléaire orphelin de la famille des récepteurs aux hormones stéroïdes et thyroïde (Park et al., 2003), contrôle le niveau d'expression de protéines associées aux microtubules, MAP1B et MAP2. MAP1B et MAP2 régulent la dynamique des microtubules (Dehmelt and Halpain, 2004). COUP-TF1 contrôle aussi l'expression de la petite Rho GTPase Rnd2 (ou RhoN ou Rho7) (Alfano et al., 2011), impliquée dans la dynamique du cytosquelette d'actine (Bertling et al., 2004).	forte augmentation de l'épaisseur de la CA, faisceaux ectopiques de la CA innervant le cortex rostro-médial anomalies de projections : les projections hippocampo-septales entrent dans la CA et les fibres de la CA projettent dorsalement dans le territoire de la commissure hippocampique	fibres cortico-thalamiques corps calleux commissure hippocampique
TUBβ3 (Tischfield et al., 2010)	microtubules Isotype III de la β-tubuline, spécifique des neurones (Katsetos et al., 2003) ; les microtubules enrichis en TUBβ3 sont beaucoup plus dynamiques que ceux composés des autres isotypes de la β-tubuline (Panda et al., 1994). TUBβ3 est particulièrement exprimée au cours du développement, notamment aux stades de guidage axonal et de maturation neuronale. Les microtubules dynamiques ont un rôle dans la réponse aux molécules de guidage/facteurs de croissance (Gordon-Weeks, 2004 ; Kalil and Dent, 2005).	mutants R262C/R262C : à E18 les axones de la pCA ne traversent pas la ligne médiane, mais sont présents au bon endroit	corps calleux nerf occulomoteur
KIF1Bβ (Zhao et al., 2001)	microtubules Kinésine (protéine moteur de transport antérograde le long des microtubules) impliquée dans le transport des vésicules synaptiques.	CA absente à E18.5	capsule interne
JNK1 (Chang et al., 2003)	microtubules + adhésions focales *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK), kinase de la famille des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases; Microtubule-Associated Protein Kinase*). Rôle dans le maintien du niveau de phosphorylation de MAP2 (Sanchez et al., 2000), facilitant son interaction avec les microtubules et son activité promotrice dans l'assemblage des microtubules.	au stade post-natal P6, réduction de la CA, qui disparaît totalement à P12, problème de maintenance des axones	
JSAP1 (Ha et al., 2005)	adhésions focales *JNK/Stress-activated protein kinase Associated Protein 1,* protéine d'assemblage pour les composants de la voie de signalisation JNK (Kelkar et al., 2000) ; interaction avec la kinase d'adhésion focale FAK, permettant le désassemblage des adhésions focales au cours de la migration. JSAP1 contrôle les niveaux de phosphorylation de JNK et FAK (Cho et al., 2011).	formation des branches de la CA correcte mais pas de traversée de la ligne médiane à E18	corps calleux capsule interne axones cortico-thalamiques

Protéines	Fonction(s)	Défauts de commissure antérieure observés chez la souris mutée	Autres faisceaux d'axones affectés chez la souris mutée
Frizzled-3 (Wand et al., 2002)	**jonctions adhérentes** Récepteur à 7 domaines transmembranaires de Wnt ; contrôle l'activité de la β-caténine (composante des jonctions adhérentes). 2 hypothèses pour le rôle de Frizzled-3 : -régulation des interactions adhésives avec les composants de la matrice extracellulaire - coordination de la polarité du cytosquelette et donc de la cellule.	CA absente à E18	corps calleux commissure hippocampique capsule interne
Celsr3 (Zhou et al., 2008)	**jonctions adhérentes** Cadhérine à 7 domaines transmembranaires, rôle dans les adhésions cellulaires (interactions homophiliques). Celsr3 est exprimée dans les neurones du cortex, du télencéphale ventral, des structure olfactives et du thalamus (Tissir et al., 2002). Celsr3 est exprimée à la membrane des « cellules de guidage » (*guidepost cells*).	les axones de la CA n'atteignent pas la ligne médiane	capsule interne tractus cortico-spinal
Fgfr1/3 (Tole et al., 2006 ; Moldrich et al., 2011)	**facteurs de croissance** *Fibroblast growth factor receptrors* Les facteurs de croissance des fibroblastes (Fgfs) sont des morphogènes connus pour réguler la différentiation cellulaire, la prolifération, la migration et le guidage axonal dans le système nerveux en développement (Iwata and Hevner, 2009). Les récepteurs tyrosine-kinases aux Fgfs stimulent les voies de signalisation des Fgfs. **Fgfr1** est fortement exprimé au cours du développement par les précurseurs des cellules de la ligne médiane. L'interaction de Fgf8 (ligand de Fgfr1) avec Fgfr1 permettrait la spécification des cellules gliales de la ligne médiane et des cellules du septum (Tole et al., 2006). **Fgfr3** participerait à la neurogénèse précoce dans les régions cérébrales de la ligne médiane traversées par les axones de la commissure antérieure (Moldrich et al., 2011).	Fgfr1-/- : les axones de la CA n'atteignent pas la ligne médiane Fgfr3 -/- : réduction des composantes caudale et latérale de la CA	Fgfr1-/- : corps calleux commissure hippocampique septum Fgfr3-/- : réduction du poids et de la taille globale du cerveau réductions de l'hippocampe et du cortex épaisseur réduite du cortex axones thalamo-corticaux capsule interne

Protéines	Fonction(s)	Défauts de commissure antérieure observés chez la souris mutée	Autres faisceaux d'axones affectés chez la souris mutée
Nfia (Shu et al., 2003)	facteur de transcription « Nuclear factor I » interaction avec le promoteur de la GFAP, rôle dans la formation des structures gliales de la ligne médiane.	CA réduite mais les axones traversent la ligne médiane, le tunnel glial entourant la CA est fortement réduit.	corps calleux commissure hippocampique
Tbr1 (Hevner et al., 2001)	facteur de transcription Forte expression dans les neurones corticaux glutamatergiques jeunes	absence de CA	fibres cortic-thalamiques et thalamo-corticales corps calleux
Ndst1 (Grobe et al., 2005)	protéoglycans *N-Deacetylase/N-SulfoTransferase 1,* enzyme de modification de l'héparan sulfate GlcNAc, permet la génération dans la molécule d'héparan sulfate des sites sulfatés de liaison à ses ligands.	absence de CA	commissure hippocampique tractus olfactifs
Ext1 (Inatani et al., 2003)	protéoglycans *EXosTocin,* enzyme catalysant la polymérisation des résidus de sucres GlcA et GlNAc de manière alternée, nécessaire à la biosynthèse de l'héparan sulfate.	faisceaux d'axones de la CA anormaux, les axones ne traversent pas la ligne médiane	corps calleux commissure hippocampique tractus olfactifs

Protéines	Fonction(s)	Défauts de commissure antérieure observés chez la souris mutée	Autres faisceaux d'axones affectés chez la souris mutée
neuropiline-2 (Giger et al., 2000)	 **guidage axonal** Récepteur aux Séma3B, Séma3C, Séma3F ; exprimé par les neurones du cortex piriforme, en particulier les neurones des couches 2 et 3.	perte totale de la CA chez certains embryons ou CA très réduite en taille et défasciculée, aCA : déplacement des axones vers les régions ventrales	nerfs trochléaire et occulomoteur nerfs spinaux fasciculus rétroflexus fornix tractus infrapyramidal des fibres moussues du gyrus denté (hippocampe) LOT
sémaphorine 3F (Sahay et al., 2003)	 **guidage axonal** Molécule sécrétée répulsive, récepteur : neuropiline-2.	défasciculation, peu d'axones traversent la ligne médiane en petits fascicules de manière chaotique aCA : les axones projettent dorsalement et ventralement au plan horizontal normal de projection	nerfs trochléaire et occulomoteur fasciculus rétroflexus, stria terminalis tructus infrapyramidal des fibres moussues du gyrus denté (hippocampe) LOT
sémaphorine 3B (Falk et al., 2005)	 **guidage axonal** Molécule sécrétée, récepteur : neuropiline-2. Action répulsive sur les axones de la pCA, action attractive sur les axones de l'aCA. Cette dualité de fonction de la Séma3B reposerait sur l'activation et la localisation sous-membranaire de FAK. En présence de Séma3B, FAK est phosphorylée et présente une localisation sous-membranaire dans les axones de l'aCA alors qu'elle reste localisée dans le cytoplasme des axones de la pCA. En conditions attractives, FAK phosphorylée est enrichie dans les cônes de croissance, et forme un complexe avec la kinase de la famille Src, Fyn dont le niveau de phosphorylation est également augmenté (J. Falk et al., 2005).	défasciculation, mais pas de réduction notoire du nombre d'axones aCA : déplacement des axones vers les régions ventrales & latérales	
NrCAM (Falk et al., 2005)	 **guidage axonal + adhésion** Molécule transmembranaire de la superfamille des IgCAMs ; interagit avec la neuropiline-2 et participe aux réponses aux Séma3B et Séma3F. NrCAM est exprimée par les axones de la CA (flèche) et par ceux du tractus latéral olfactif (tête de flèche) (Lustig et al., 2001).	défasciculation, mais pas de réduction notoire du nombre d'axones aCA : déplacement des axones vers les régions ventrales & latérales	

Protéines	Fonction(s)	Défauts de commissure antérieure observés chez la souris mutée	Autres faisceaux d'axones affectés chez la souris mutée
plexine-A4 (Suto et al., 2005)	guidage axonal Co-récepteur, interagit avec la neuropiline, participe aux réponses aux Séma3A et Séma6A.	aCA : anomalie de décussation et erreurs de trajectoires, les axones de l'AON sont déviés dans les régions ventrales.	nerfs périphériques fibres cortico-thalamiques (cortex somato sensoriel, barrels)
sémaphorine 6A (Rünker et al., 2011)	guidage axonal Sémaphorine non sécrétée, ancrée à la membrane par une ancre GPI, récepteur : plexine-A2 et A4. La Séma6A est exprimée par les neurones dont les axones forment la CA et permettrait la répulsion des axones via son interaction avec la plexine A4.	aCA non affectée pCA : les axones ne traversent pas la ligne médiane mais projettent vers les régions ventrales du télencéphale	fornix
EphA4 (Kullander et al., 2001)	guidage axonal Récepteur des ephrines, exprimé latéralement entre les branches de la CA et par les axones de la pCA. Action répulsive restreignant les axones de l'aCA de manière latérale, et permettant de maintenir la ségrégation des axones aCA/pCA (Ho et al., 2009).	aCA : déplacement latéral & ventral et défasciculation	
 **EphB2** (Henkemeyer et al., 1996)	guidage axonal Récepteur des ephrines B1-3, exprimé à la ligne médiane. Action répulsive empêchant aux axones de la pCA de projeter vers le plancher du télencéphale.	aCA non affectée pCA très réduite, quelques faisceaux d'axones dans des régions plus ventrales par rapport au plan normal de projection	
ephrine B2 (Cowan et al., 2004)	guidage axonal Ligand transmembranaire de EphB2 et EphA4, exprimé par les axones de la CA. La signalisation inverse induite par la partie intracellulaire de l'ephrine-B2 est nécessaire au guidage des axones de la pCA. Les souris mutées dont l'ephrine-B2 à la membrane n'a pas de domaine intracellulaire, présentent le même phénotype que les souris mutées pour EphB2.	aCA non affectée pCA très réduite, quelques faisceaux d'axones dans des régions plus ventrales par rapport au plan normal de projection	
Nck1/2 (Fawcett et al., 2007)	guidage axonal Adaptateurs SH2/SH3, couplage des signaux phospho-tyrosines aux réorganisations du cytosquelette d'actine; rôle dans les voies de signalisation Eph, en particulier EphA4, et dans les voies de signalisation DCC.	pCA absente	neurones moteurs de la moelle épinière tractus cortico-spinal

Protéines	Fonction(s)	Défauts de commissure antérieure observés chez la souris mutée	Autres faisceaux d'axones affectés chez la souris mutée
DCC (Fazelli et al., 1997)	guidage axonal *Delected in Colorectal Cancer*, récepteur de la nétrine et de draxine. DCC relaie l'action attractive de la nétrine-1. DCC interagit avec les kinases d'adhésion focale Src et Fyn, avec l'adaptateur Nck (Li et al., 2004 ; Li et al., 2002). La phosphorylation de DCC par Fyn est nécessaire à la stimulation de la croissance axonale induite par la nétrine-1 (Ren et al., 2004 ; Liu et al., 2004).	aCA : faisceau d'axones abérents projettant vers les régions rostrales, pas d'axones traversant la ligne médiane pCA résuite mais quelques axones traversent la ligne médiane	corps calleux commissure hippocampique capsule interne axones commissuraux de la moelle épinière LOT
nétrine-1 (Serafini et al., 1996)	guidage axonal Molécule sécrétée, récepteurs : DCC, UNC-5 et néogénine. La nétrine est fortement exprimée à la ligne médiane. Les molécules de la famille des nétrines présentent une homologie avec la laminine, molécule de la matrice extracellulaire ayant un rôle dans la croissance et le guidage axonal (pour revue voir Culotti and Kolodkin, 1996). Le modèle proposé est un modèle dans lequel des gradients de nétrine contribuent à rediriger les axones vers la ligne médiane, ce qui a particulièrement été étudié dans le cas des axones de la moelle épinière (Kennedy et al., 1994). Par ailleurs, Colamarino and Tessier-Lavigne (1995a) ont montré que la nétrine-1 peut aussi avoir une action répulsive sur les axones moteurs du nerf trochléaire.	absence totale de la CA	corps calleux commissure hippocampique commissure habénulaire pontine nucleus commissure ventrale de la moelle épinière LOT
draxine-1 (Ahmed et al., 2011)	guidage axonal *Dorsal repulsive axon guidance protein*, molécule sécrétée répulsive sans séquence d'homologie avec d'autres protéines (Islam et al., 2009), récepteur : DCC.	aCA : projections anormales vers les régions rostro-latérales, très peu d'axones traversent la ligne médiane pCA : très peu d'axones, aucun traverse la ligne médiane	corps calleux commissure hippocampique moelle épinière
Tsukushi (Ito et al., 2010)	guidage axonal Molécule de la famille des petits protéoglycans enrichis en leucines (Schaefer and Iozoo, 2008), modulateur des voies TGF-β, Notch, FGF et Wnt. Lorsqu'il se fixe sur ces molécules, Tsukushi inhibe leur activité (Ohta et al., 2004, 2006 ; Kuriyama et al., 2006 ; Morris et al., 2007). Les souris mutantes pour Tsukushi et pour draxine-1 présentent les mêmes phénotypes au niveau des commissures du télencéphale. Tsukushi et draxine ont des effets additifs dans l'inhibition de la croissance axonale des neurones du cortex in vitro et in vivo. De manière étonnante, Tsukushi n'intéragit pas avec la draxine, mais avec la nétrine (Hossain et al., 2013).	aCA : projections anormales vers les régions rostro-latérales, très peu d'axones traversent la ligne médiane PCA plus fine, les axones ne traversent pas la ligne médiane	corps calleux

III. SCHIP-1, UNE PROTEINE CYTOSOLIQUE D'INTERACTION AVEC LE CYTOSQUELETTE CORTICAL

SCHIP-1 (pour *SCHwannomin Interacting Protein 1*) est une protéine cytoplasmique, initialement identifiée comme un partenaire de la schwannomine/merline (Goutebroze et al., 2000). Elle est fortement exprimée dans le cerveau sous six isoformes. Une de ces six isoformes est particulièrement concentrée aux nœuds de Ranvier et au segment initial de l'axone, où elle est associée aux complexes moléculaires comprenant les canaux sodiques grâce à ses interactions avec le cytosquelette cortical d'ankyrine G et de spectrine βIV (Martin et al., 2008 ; Martin et al., en préparation - Article annexe 1). L'étude des souris mutées pour *Schip1* montre que SCHIP-1 est nécessaire à la morphologie et à l'organisation structurale des nœuds de Ranvier (Article annexe 1).

A. SCHIP-1, un partenaire de la schwannomine/merline

1. La merline, une protéine de la superfamille 4.1

La **merline** (pour *Moesin-Ezrin-Radixin-like protein*), aussi appelée schwannomine, est le produit du gène suppresseur de tumeur *Nf2* muté chez les patients atteints de neurofibromatose de type 2, une maladie héréditaire prédisposant au développement de tumeurs du système nerveux, principalement des schwannomes et des méningiomes (Evans et al., 1992; Rouleau et al., 1993; Trofatter et al., 1993).

La merline appartient à la superfamille des **protéines 4.1**, et présente des homologies importantes avec les protéines ERMs (Stamenkovic and Yu, 2010) (Figure 50). Elle comporte un domaine FERM (pour *Four-point one, Ezrin, Radixin, Moesin*) dans sa région N-terminale et un domaine C-terminal qui adopterait une conformation de type *coiled-coil*. Le gène codant pour la merline est composé de 17 exons. L'épissage alternatif des exons 16 ou 17 conduit à l'expression de deux isoformes principales, l'isoforme 1 et l'isoforme 2 respectivement. L'isoforme 1 présente des interactions intramoléculaires, comme les protéines ERMs, ce qui n'est pas le cas de l'isoforme 2. La phosphorylation du résidu sérine 518 de l'isoforme 1 serait impliquée dans ses changements de conformation (Rong et al., 2004) (Figure 50).

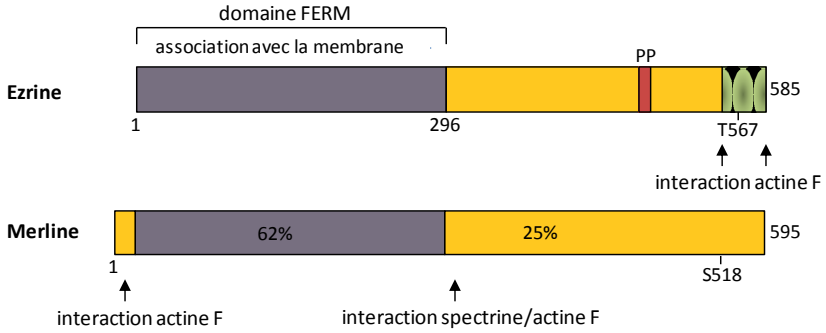


Figure 50 | Domaines structuraux de l'ezrine et de la merline. Les régions N-terminales contiennent un domaine FERM d'environ 300 résidus (en violet). Les pourcentages d'homologie avec l'ezrine sont indiqués. La merline interagit avec l'actine F *via* sa région N-terminale ou *via* son interaction avec la spectrine βII. La phosphorylation de la sérine (S) 518 de l'isoforme 1 de la merline diminue ses interactions intramoléculaires (Adapté de Bretscher et al., 2002).

La merline a la capacité d'interagir avec des protéines transmembranaires par l'intermédiaire de son domaine FERM (Kang et al., 2002). Elle interagit en outre avec l'**actine** et les **microtubules** (Brault et al., 2001; Shaw et al., 2001; Muranen et al., 2007). Elle ne possède pas le domaine d'interaction à haute affinité avec l'actine filamenteuse des protéines ERMs, mais interagit avec l'actine *via* son domaine N-terminal ou indirectement *via* la **spectrine βII** (Xu and Gutmann, 1998; Scoles et al., 1998). Des études sur l'interaction de la merline avec l'actine ont montré que la merline empêche le désassemblage des filaments d'actine (James et al., 2001). De plus, elle interfère avec diverses voies de signalisation, dont les voies des **petites GTPases Rac et Cdc42**, connues pour contrôler la dynamique du cytosquelette d'actine (Shaw et al., 2001; Morrison et al., 2007).

La merline est de fait un régulateur des interactions entre le cytosquelette et la membrane plasmique dans les cellules polarisées, comme les protéines ERMs (McClatchey and Fehon, 2009). La fonction cellulaire de la merline a principalement été étudiée dans le cadre de son rôle de suppresseur de tumeur. Ainsi, il a été montré que la merline inhibe des voies de signalisation pro-mitogéniques, comme les voies faisant intervenir Rac-PAK, mTORC1, PI3K-Akt, FAK-Src et EGFR-Ras-ERK (Cooper and Giancotti, 2014). Cependant les mécanismes par lesquels la merline inhibe ces voies de signalisation restent peu clairs, et la contribution relative des différentes voies dans les tumeurs causées par la mutation de *Nf2* n'est pas élucidée.

La merline est exprimée dans le système nerveux central par les cellules gliales et par les neurones. Sa fonction dans les neurones reste peu étudiée. Grönholm et collaborateurs ont montré que la merline est présente dans des neurones d'hippocame de rat dissociés où elle est localisée le long des prolongements et dans le corps cellulaire, de manière ponctuée (Gronholm et al., 2005). Une étude plus récente a montré que la merline inhibe la croissance neuritique (Schulz et al., 2010). Cette fonction serait dépendante de la phosphorylation du résidu sérine 518 de l'isoforme 1 et impliquerait l'inactivation de la petite GTPase Rac.

2. SCHIP-1, Schwannomine-Interacting-Protein 1

SCHIP-1 (pour *SCHwannomin Interacting Protein 1*) est une protéine cytoplasmique fortement exprimée dans le **cerveau**, le **cœur** et le **muscle** (Goutebroze et al., 2000). Elle n'appartient à aucune famille protéique répertoriée dans les banques de données. La séquence humaine de SCHIP-1 présente 99% d'homologie avec la séquence murine. Le gène codant pour SCHIP-1 est localisé sur le chromosome 3 chez l'Homme et chez la souris (région 3q25, chez l'Homme) et est composé de 14 exons. Six isoformes résultant de l'épissage alternatif de ce gène ont été identifiées par le laboratoire dans le cerveau, chez la souris et chez l'Homme (Figure 51). Ces isoformes présentent une région N-terminale spécifique à chacune d'elles et une région C-terminale conservée commune (Goutebroze et al., 2000; Martin et al.,2008; séquences non publiées) (Figure 51).

Les isoformes **IQCJ-SCHIP-1** est **IQCJ-SCHIP-1s** possèdent un motif IQ dans leur région N-terminale. Les motifs IQ sont connus pour permettre l'association de nombreuses protéines avec la **calmoduline** (Bahler and Rhoads, 2002). Le laboratoire a montré que les isoformes IQCJ-SCHIP-1 et IQCJ-SCHIP-1s sont effectivement capables d'interagir avec la calmoduline en absence de Ca^{2+}. Cette interaction est perdue si les résidus IQ sont mutés en alanines (Martin et al., 2008).

La région conservée C-terminale de SCHIP-1 contient un motif ***leucine zipper*** supposé adopter une conformation de type *coiled-coil* connue pour assurer des interactions protéine-protéine et l'homodimérisation. Il a été montré au laboratoire que SCHIP-1 est capable de s'oligomériser (Goutebroze et al., 2000). Au cours de l'évolution, le motif *leucine zipper* est fortement conservé chez les xénope, danorerio, rat, chien, macaque et pantroglodyte (98 à 99% d'homologie), suggérant un rôle physiologique conservé et nécessaire de SCHIP-1.

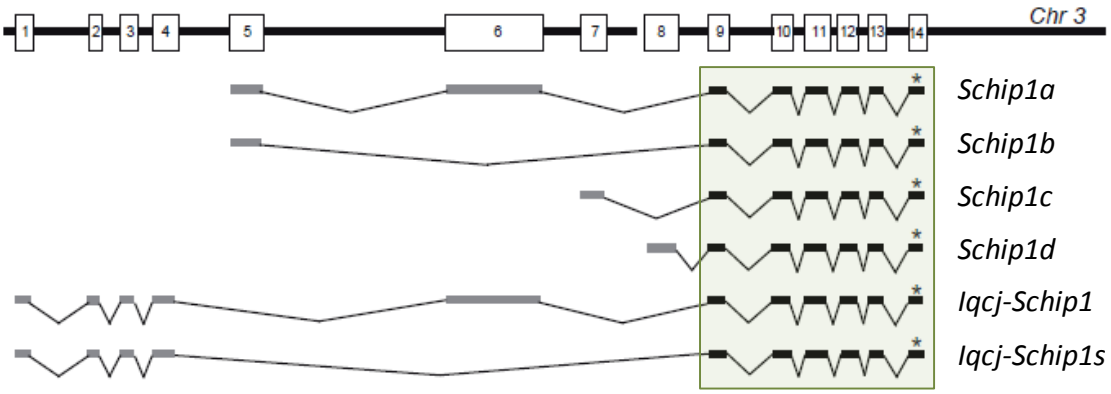


Figure 51 | Les isoformes de *Schip1*. Le gène *Schip1* est localisé sur le chromosome 3 chez l'Homme et chez la souris. Six isoformes de *Schip1* ont été identifiées résultant de l'épissage alternatif du gène. Ces isoformes présentent une région N-terminale spécifique à chacune d'elles et une région C-terminale conservée commune (encadré vert) (Goutebroze et al., 2000 ; Martin et al., 2008) (numéros d'accession *GenBank* : SCHIP-1a, EU163407 ; SCHIP-1b, EU1633408 ; SCHIP-1c, NM_013928.5 ; IQCJ-SCHIP-1, EU163409 ; IQCJ-SCHIP-1s, KJ941154).

La protéine **SCHIP-1** a initialement été identifiée, lors d'un crible double-hybride chez la levure, comme un partenaire de la **merline** (Goutebroze et al, 2000). Cette interaction fait intervenir son motif *leucine zipper* et les deux régions d'interaction de la merline avec l'actine (Figure 52).

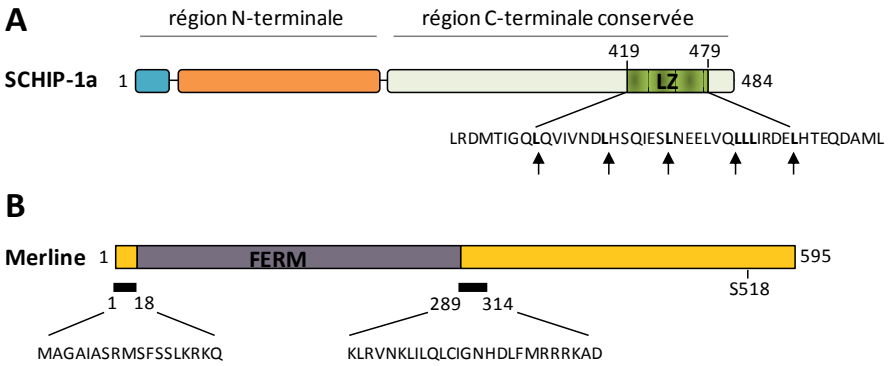


Figure 52 | SCHIP-1 interagit avec la merline. ***A***, Domaines protéiques de l'isoforme SCHIP-1a. La région N-terminale est spécifique à SCHIP-1a ; la région C-terminale est partagée par toutes les isoformes. La séquence en acides-aminés du motif *leucine zipper* (LZ) riche en leucines (L, flèches) est indiquée au-dessous. SCHIP-1 interagit avec la merline *via* ce domaine *leucine zipper*. ***B***, Domaines protéiques de la merline. Les régions d'interaction avec SCHIP-1 sont indiquées par les traits noirs et la séquence correspondante en acides-aminés au-dessous (Adapté de Goutebroze et al., 2000).

Des alignements de séquences ont montré que le domaine *coiled-coil* de SCHIP-1 contenant le motif *leucine zipper* présente plus de 70% d'identité avec le domaine *coiled-coil* des protéines humaines **FEZ1 et FEZ2** (*fasciculation and elongation protein zeta*) et 59% avec celui de leur orthologue UNC-76 chez *C. elegans* (Goutebroze et al., 2000) (Figure 53). Ces deux protéines sont fortement exprimées dans le système nerveux et participent à la croissance axonale (Kuroda et al., 1999; Fujita et al., 2004). FEZ1 et UNC-76 interagissent *via* leur domaine *leucine zipper* avec la kinésine KIF5A (Fujita et al., 2007; Kuroda et al., 1999), un moteur moléculaire spécialisé dans le transport des mitochondries. FEZ1 participerait à la croissance axonale en jouant un rôle dans le transport des mitochondries le long de l'axone. En effet, FEZ1 co-localise avec les mitochondries (Fujita et al., 2007) et est nécessaire à leur transport antérograde le long des microtubules dans des neurites de cellules PC12 différenciées (Fujita et al., 2007). SCHIP-1 pourrait donc jouer un rôle analogue à celui de FEZ-1 dans le transport le long des microtubules. Cette hypothèse est en cours d'investigation au laboratoire.

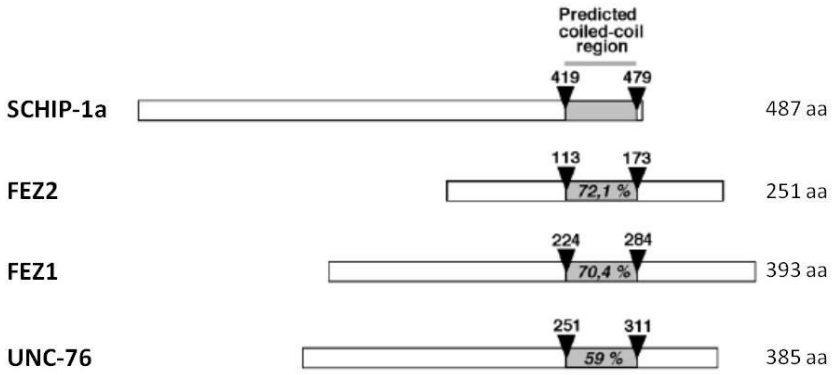


Figure 53 | Homologie de la région conservée de SCHIP-1 avec FEZ et UNC-76. La région C-terminale (aa 419-479) de SCHIP-1a, qui comprend le domaine *coiled-coil*, présente une forte homologie avec celle des protéines FEZ2 et FEZ1 et leur orthologue chez le nématode, UNC-76 (Goutebroze et al., 2000).

B. IQCJ-SCHIP-1 est concentrée au nœud de Ranvier et au segment initial de l'axone

1. Myélinisation et nœuds de Ranvier

Au cours de l'évolution, des mécanismes d'**accumulation de canaux ioniques** ont permis aux neurones des Mammifères d'augmenter significativement la vitesse de conduction du potentiel d'action (Hill et al., 2008). La concentration en canaux ioniques dans la partie proximale de l'axone, appelée **segment initial**, permet l'intégration des entrées synaptiques en une réponse « tout-ou-rien », appelée potentiel d'action (Figure 54). Une fois générés, les potentiels d'action se propagent le long de l'axone sur de longues distances.

Dans les axones non-myélinisés, la distribution des canaux sodiques dépendants du voltage (Na_v) est homogène tout le long de l'axone, le flux de courant est donc continu (Waxman et al., 1983). Dans les axones myélinisés, les canaux Na_v sont concentrés dans des structures hautement différenciées entre deux segments de myéline, appelées **nœuds de Ranvier**, ce qui permet une conduction rapide dite **saltatoire** du potentiel d'action, de nœud en nœud (Rasband, 2011) (Figure 54). La conduction saltatoire et la résistance élevée conférée par la gaine de myéline vont permettre une perte énergétique moindre, et donc une conduction environ 100 fois plus rapide des potentiels d'action que dans les axones non myélinisés.

Chez les Mammifères, la myélinisation des axones est assurée par des **cellules gliales myélinisantes** : les cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique (SNP) et les oligodendrocytes dans le système nerveux central (SNC). Une cellule de Schwann myélinise un seul axone, alors qu'un oligodendrocyte peut myéliniser plusieurs axones, formant jusqu'à 40 segments de myéline. Les **interactions axogliales** sont nécessaires au cours du développement pour la formation des fibres myélinisées. La croissance de l'axone précède et régule la gliogenèse

par des actions mitogéniques et trophiques, ce qui assure un nombre de cellules gliales proportionnel à la longueur de l'axone (Barres and Raff, 1999; Mirsky et al., 2002). Les interactions avec les cellules gliales myélinisantes vont en retour remodeler les axones et conduire à la formation des nœuds de Ranvier.

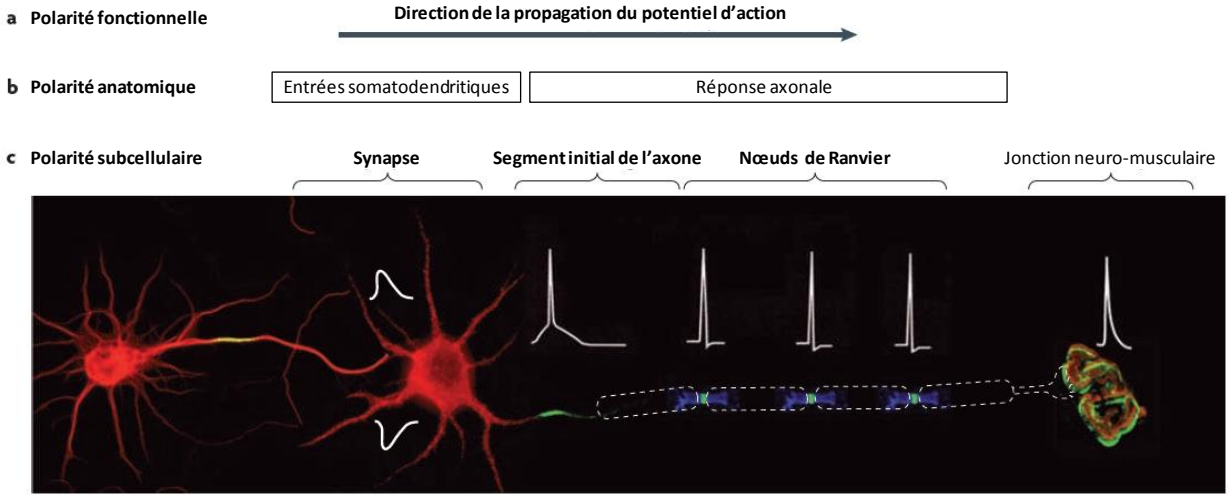


Figure 54 | Les neurones sont des cellules polarisées. ***a***, Les entrées synaptiques excitatrices et inhibitrices sont intégrées au niveau du segment initial de l'axone, qui initie les potentiels d'action. Les potentiels d'action se propagent ensuite le long de l'axone grâce aux canaux ioniques concentrés aux nœuds de Ranvier. Enfin, le neurotransmetteur est libéré à l'extrêmité axonale. ***b***, Les neurones sont polarisés anatomiquement et peuvent être sous-divisés en un compartiment somatodendritique d'entrées synaptiques et un compartiment axonal de sortie. Le segment initial permet de séparer ces deux compartiments. ***c***, Les neurones présentent une polarité subcellulaire, les principaux domaines étant les synapses, les segments initiaux, les nœuds de Ranvier et les jonctions neuro-musculaires. Chacun de ces domaines est enrichi en canaux ioniques, récepteurs, molécules d'adhésion et protéines d'échaffaudage moléculaire spécifiques, qui permettent la propagation unidirectionnelle des potentiels d'action. Chacun de ces domaines subcellulaires engendre une réponse électrophysiologique unique (montrée en blanc) (Adapté de Rasband, 2011).

La gaine de myéline est organisée en deux structures distinctes : la myéline compacte et la myéline non compacte (Figure 55). La **myéline compacte** correspond aux régions de la cellule gliale dépourvues de cytoplasme. Les faces extracellulaires des membranes plasmiques adjacentes sont accolées suite à l'enroulement de la myéline autour de l'axone et à l'élimination du cytoplasme. Les membranes plasmiques de ces régions sont essentiellement composées de lipides, permettant l'isolation électrique. La myéline non compacte correspond à des régions où le cytoplasme persiste comme le compartiment cytoplasmique du corps de la cellule gliale, les boucles paranodales, les incisures de Schmidt-Lanterman et les microvillosités spécifiques des cellules de Schwann (Figure 55).

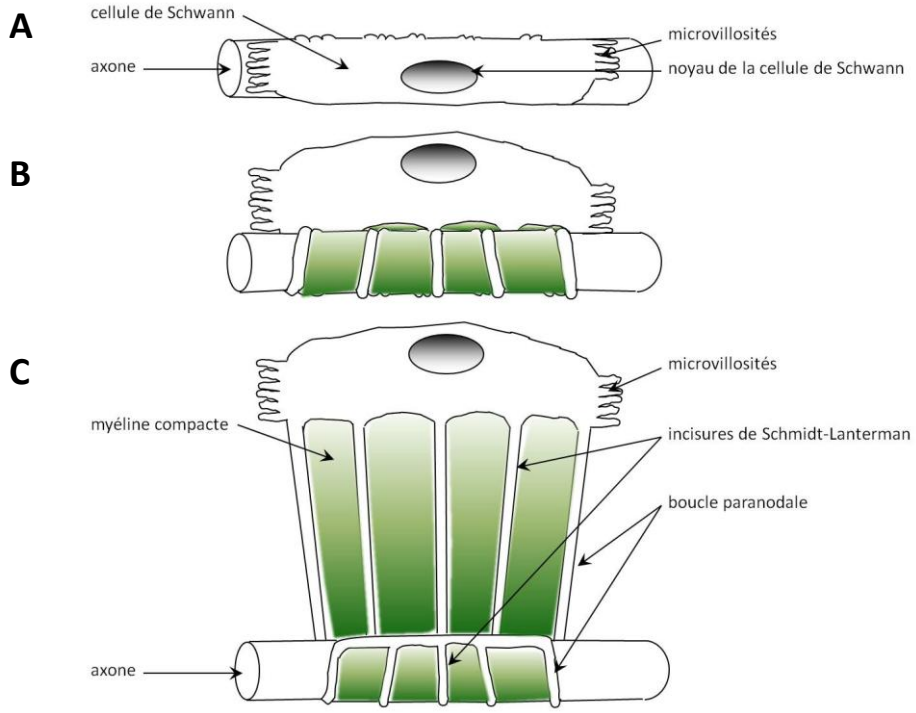


Figure 55 | Organisation de la gaine de myéline autour de l'axone dans le SNP. Représentation schématique d'une cellule de Schwann myélinisante « virtuellement déroulée ». ***A***, La cellule de Schwann est « enroulée » autour de l'axone. ***B***, Déroulement de la cellule de Schwann. ***C***, Représentation des microvillosités, des incisures de Schmidt-Lanterman et des boucles paranodales de la cellule de Schwann. En vert sont représentées les régions de myéline compacte (K. Oguievetskaia, non publié).

Des contacts spécifiques s'établissent entre la cellule gliale et l'axone au niveau des nœuds de Ranvier, et conduisent à différencier trois sous-domaines, le nœud, le paranœud et le juxtaparanœud (Figure 56). Le **nœud** à proprement dit, où sont localisés les canaux Na_v, est entouré par les microvillosités des cellules de Schwann dans le SNP (Figure 56) et par des pieds astrocytaires dans le SNC. De part et d'autre du nœud se situent les **régions paranodales**. Dans ces régions, les **boucles paranodales** cytoplasmiques des cellules gliales sont associées à la membrane axonale par des **jonctions de type septé**. Au delà des paranœuds se situent les **régions juxtaparanodales**, qui ne présentent pas de contact cellulaire spécifique mais sont caractérisées par l'enrichissement en canaux potassiques dépendants du voltage de type *shaker* (K_v1), qui permettent de moduler l'amplitude, la durée et la fréquence des potentiels d'action. Le segment entre deux nœuds de Ranvier est appelé **internœud** (Girault and Peles, 2002).

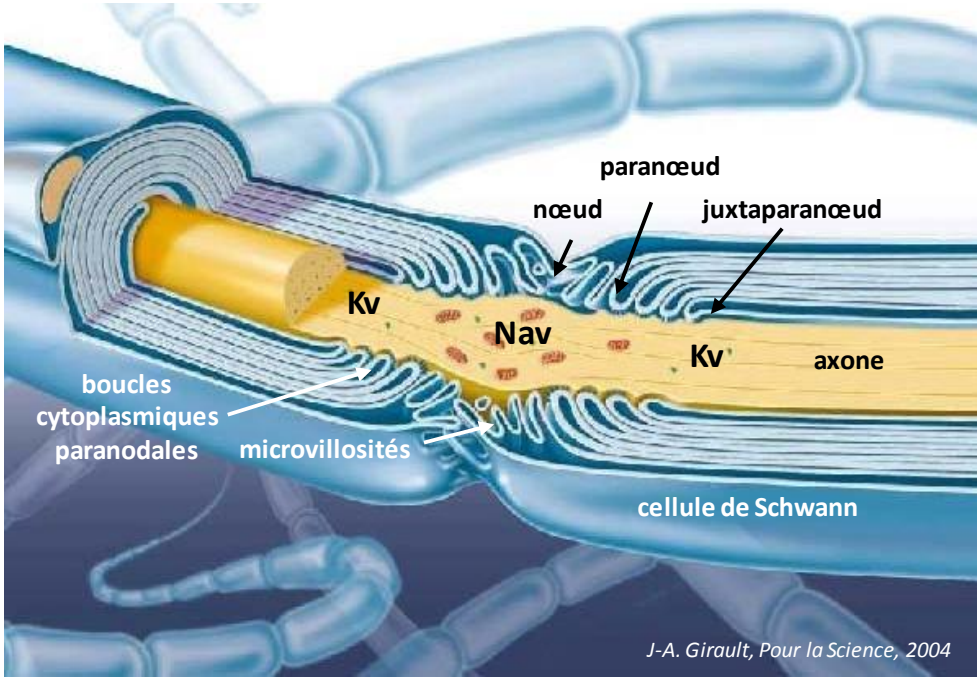


Figure 56 | Organisation du nœud de Ranvier. Schéma en 3 dimensions d'un nœud de Ranvier du SNP. Les cellules de Schwann constituent la gaine de myéline autour de l'axone, qui est interrompue au niveau du nœud où elles forment des microvillosités. Le nœud est enrichi en canaux Na_v. Au niveau du paranœud, la cellule de Schwann forme des boucles cytoplasmiques. Le juxtaparanœud est enrichi en canaux K_v (Adapté de Girault, 2004).

2. Complexes moléculaires et organisation du nœud de Ranvier et du segment initial de l'axone

a) Le nœud de Ranvier

(i) Paranœuds et juxtaparanœuds

Au niveau des paranœuds et juxtaparanœuds, sont localisés des complexes protéiques intercellulaires majeurs comprenant des molécules d'adhésion de la famille Caspr (pour *contactin-associated protein*) aussi appelée NCP (pour *Neurexin - Caspr - Paranodin*), associées en *cis* et en *trans* avec les protéines de la superfamille IgCAM, dont des protéines de la famille des contactines. Les protéines Caspr sont des glycoprotéines transmembranaires présentant des homologies avec les neurexines. Leur région extracellulaire est composée de différents sous-domaines, incluant un domaine discoidine, plusieurs modules de laminine-G et d'homologie avec l'EGF (Menegoz et al., 1997; Peles et al., 1997). Leur région intracellulaire comprend un motif protéique conservé GNP (pour *Glycophorin C - Neurexin IV - Paranodin*), caractérisé au laboratoire (Menegoz et al., 1997; Girault et al., 1998). Ce motif est impliqué dans les

interactions avec le domaine FERM des protéines de la superfamille 4.1 (Denisenko-Nehrbass et al., 2003).

Aux **paranœuds**, la protéine Caspr/paranodine, exprimée par l'axone, s'associe en *cis* avec la contactine-1/F3 qui interagit en *trans* avec la neurofascine 155 (NF155) exprimée par la cellule gliale (Figure 57). Les régions extracellulaires de la contactine-1/F3 et de NF155 comprennent 4 domaines fibronectine de type III et six domaines immunoglobuline. Les domaines immunoglobulines de la contactine-1/F3 sont nécessaires à ses interactions avec NF155 et Caspr. Les domaines immunoglobulines de NF155 sont nécessaires à son interaction avec la contactine-1/F3 (Rios et al., 2000; Charles et al., 2002). Chacune des protéines des complexes paranodaux est nécessaire à la formation des jonctions de type septé, qui jouent un rôle de barrière de diffusion permettant la séparation des compartiments nodaux et juxtaparanodaux (Bhat et al., 2001; Boyle et al., 2001). Ces jonctions jouent également un rôle de barrière électrique importante pour la propagation du potentiel d'action (Bhat et al., 2001; Boyle et al., 2001; Sherman and Brophy, 2005; Zonta et al., 2008).

Aux **juxtaparanœuds**, la protéine Caspr2 exprimée par l'axone, s'associe en *cis* avec la protéine TAG-1/contactine-2 qui interagit en *trans* avec une autre protéine TAG-1 exprimée par la cellule gliale. Ces interactions font intervenir les domaines immunoglobulines de TAG-1/contactine-2 (Savvaki et al., 2010) (Figure 57). Ces complexes protéiques sont nécessaires à l'enrichissement des canaux K_v1 aux juxtaparanœuds (Poliak et al., 2003; Savvaki et al., 2010; Traka et al., 2003). Une protéine transmembranaire de la famille des métalloprotéases, ADAM22 (pour *disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 22*) est également retrouvée concentrée dans ces régions et permet le recrutement des protéines d'échaffaudage PSD-93 et PSD-95, contenant des domaines d'interaction PDZ (pour *PSD-95/Discs large/Zona occludens-1*) (Ogawa et al., 2010; Horresh et al., 2010). Il a été proposé que les protéines PSD-93 et PSD-95 pourraient assurer l'interaction entre les canaux K_v1 et Caspr2 qui contient un site d'interaction avec des protéines à domaines PDZ dans son extrémité C-terminale. Cependant, l'absence des protéines PSD-93 et PSD-95 chez la souris n'empêche pas l'accumulation des canaux K_v1 (Rasband et al., 2002; Horresh et al., 2008).

Les complexes protéiques intercellulaires paranodaux et juxtaparanodaux sont associés au cytosquelette axonal d'actine grâce à l'interaction des protéines Caspr avec la **protéine 4.1B** (Denisenko-Nehrbass et al., 2003) (Figure 57). L'absence de la protéine 4.1B chez les souris mutées conduit à une perte la concentration des protéines transmembranaires du juxtaparanœud (Caspr2, TAG-1/contactine-2, K_v1), soulignant l'importance de la protéine 4.1B pour la formation et l'organisation des régions juxtaparanodales dans les axones myélinisés (Horresh et al., 2010; Buttermore et al., 2011; Cifuentes-Diaz et al., 2011; Einheber et al., 2013).

La protéine 4.1B pourrait interagir avec les **spectrines αII** et **βII**, également concentrées dans les paranœuds et juxtaparanœuds, *via* son domaine d'interaction à la spectrine. L'**ankyrine B** est également concentrée au niveau d'un sous-domaine des paranœuds, où elle pourrait interagir avec les spectrines αII et βII (Denisenko-Nehrbass et al., 2003; Ogawa et al., 2006; Engelhardt et al., 2013).

(ii) Nœud

Au niveau du **nœud**, les canaux Na_v font partie de complexes protéiques dont les composants majeurs sont les canaux potassiques dépendants du voltage de type KCNQ et des molécules d'adhésion de la superfamille IgCAM, NrCAM et neurofascine 186 (NF186) (Poliak and Peles, 2003) (Figure 57). Dans le système nerveux central, on retrouve également la molécule d'adhésion contactine/F3. Toutes ces protéines sont ancrées au cytosquelette d'actine via leur interaction avec le cytosquelette cortical d'**ankyrine G** qui interagit avec et recrute la **spectrine βIV** (Devaux et al., 2003; Devaux et al., 2004; Davis et al., 1996; Hortsch, 2000) (Figure 57). Par ailleurs, la matrice extracellulaire retrouvée au niveau du nœud a une composition spécifique. Aux nœuds du SNC sont retrouvés des protéoglycans chondroitine-sulfate sécrétés, les brevican et versican, qui interagissent avec des protéines de la matrice extracellulaire, comme les tenascines (Bekku et al., 2009). Dans le SNP les cellules de Schwann sécrètent la protéine d'adhésion NrCAM et la gliomedine. La gliomedine est une molécule trimérique N-glycosylée qui est incorporée à la matrice extracellulaire et interagit avec NF186 et NrCAM (Eshed et al., 2005; Eshed et al., 2007; Maertens et al., 2007).

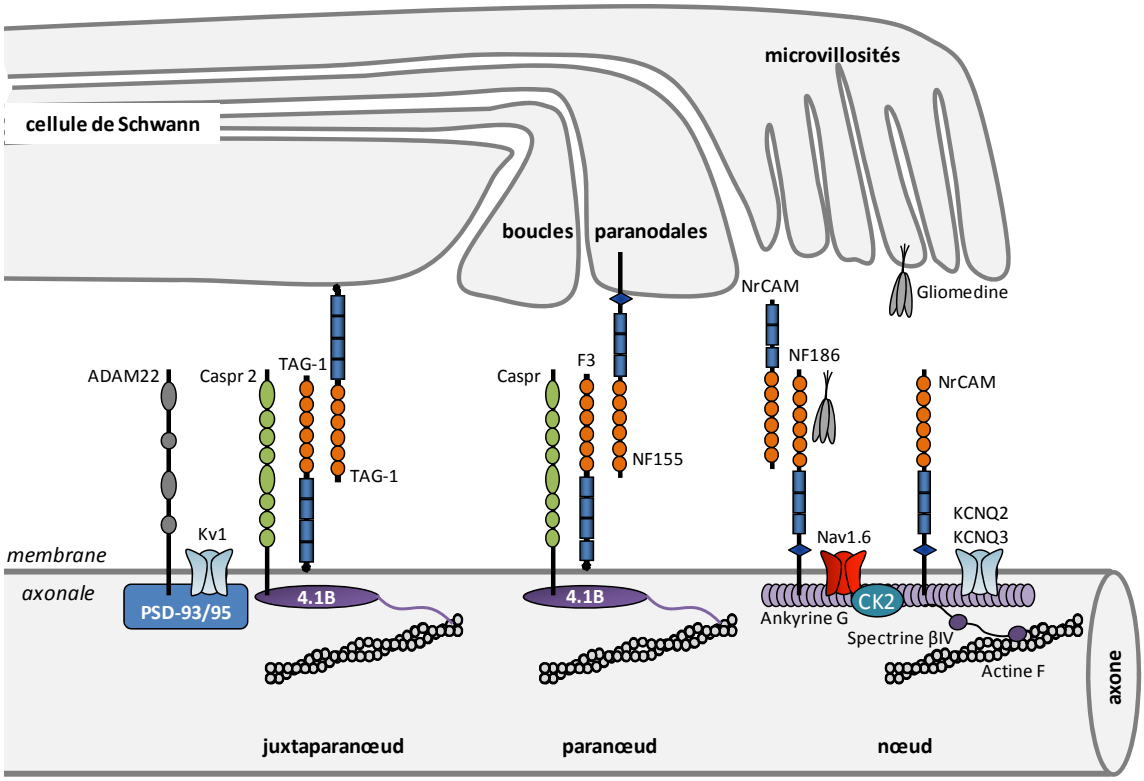


Figure 57 | Complexes moléculaires simplifiés au niveau des contacts axogliaux du nœud de Ranvier du SNP (Adapté de Girault and Peles, 2002; Faivre-Sarrailh and Devaux, 2013).

Les **canaux sodiques dépendants du voltage** sont des complexes protéiques hétéromériques composés de trois sous-unités : **α/Na_v1** (260 kDa), **β1** (36kDa) et **β2** (33kDa) (Catterall, 2000) (Figure 58). La **sous-unité α** possède 6 domaines transmembranaires et s'organise en tétramère, chaque domaine étant relié au suivant par une large boucle cytoplasmique. Les extrémités N- et C- terminales sont cytoplasmiques (Catterall, 2000). Neuf membres de sous-unités α sont connus (Na_v1.1 à Na_v1.9) (George, 2005). Les sous-unités Na_v1.2 et 1.6 sont responsables de la génération et de la propagation des potentiels d'action dans le segment initial de l'axone et les nœuds de Ranvier. La sous-unité Na_v1.2 est exprimée au cours du développement ; une fois le nœud de Ranvier formé, elle est remplacée par la sous-unité Na_v1.6, majoritaire chez l'adulte (Boiko et al., 2001; Caldwell et al., 2000; Tzoumaka et al., 2000). Le motif d'interaction des canaux Na_v1 avec l'ankyrine G se situe dans la boucle cytoplasmique entre les domaines II et III (Cooper, 2011) (Figure 58). Cette interaction est dépendante de la phosphorylation de l'ankyrine G par la kinase CK2, aussi retrouvée concentrée au nœud de Ranvier (Brechet et al., 2008; Garrido et al., 2003; Lemaillet et al., 2003).

Les **sous-unités β** sont des protéines transmembranaires ayant une large région extracellulaire N-terminale et une courte région cytoplasmique ; elles joueraient un rôle dans la localisation des sous-unités α/Na_v1 à la membrane (Isom et al., 1995; Yu and Catterall, 2003). La région extracellulaire est formée par un domaine d'homologie aux immunoglobulines (Ig) de type V, commun aux membres de la superfamille des immunoglobulines. Ce domaine de la sous-unité β1 permet l'interaction directe avec les molécules d'adhésion NrCAM, NF186 et NF155, et la contactine dans le système nerveux central (McEwen et al., 2004). Ce domaine peut également interagir de manière homophilique, ce qui participerait au recrutement de l'ankyrine G (Malhotra et al., 2000). Le domaine de type Ig de la sous-unité β2 interagit quant à lui avec des molécules de la matrice extracellulaire, les tenascines C et R, qui s'associent avec la protéine brevican (Murakami and Ohtsuka, 2003; Srinivasan et al., 1998).

Les canaux potassiques dépendants du voltage de type **KCNQ2** et **KCNQ3** (ou K_v7.2 et K_v7.3 respectivement) retrouvés au nœud sont responsables de la génération de courants M, qui permettent de moduler l'activité des canaux Na_v et donc l'amplitude et la fréquence des potentiels d'action. Des mutations dans ces canaux conduisent à une hyperexcitabilité des neurones (Maljevic et al., 2008). Ces canaux sont composés de 6 domaines transmembranaires et leurs extrémités N- et C- terminales sont cytoplasmiques (Cooper, 2011) (Figure 58). La région C-terminale cytoplasmique est longue et possède notamment un domaine d'interaction avec les phospholipides membranaires (PIP2, pour *phosphatidylinositol4,5-biphosphate*), deux domaines d'interaction avec la calmoduline, un domaine de tétramérisation (SID, pour *subunit interaction domain*) et un motif d'interaction avec l'ankyrine G, présentant une forte analogie avec le motif des canaux Na_v (Pan et al., 2006) (Figure 58).

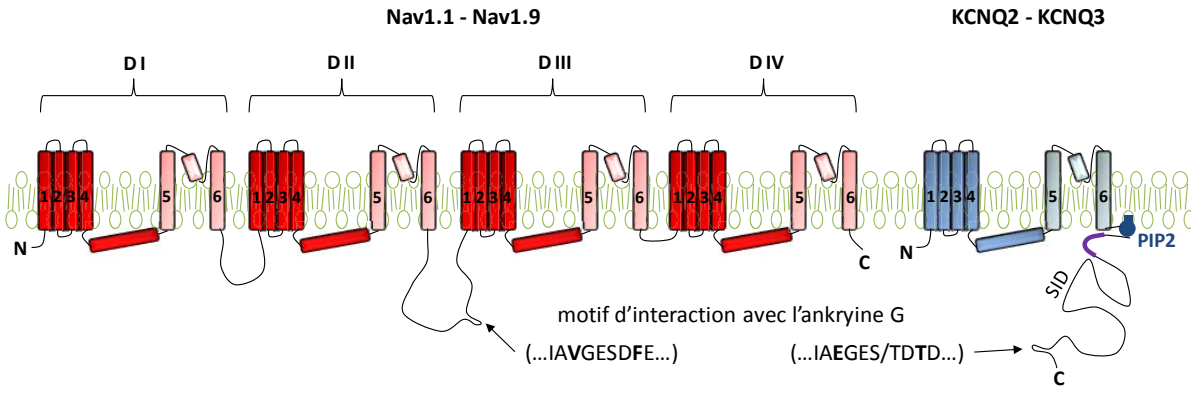


Figure 58 | Les canaux Na_v1 et KCNQ2/3 et leur motif d'interaction avec l'ankyrine G. Les sous-unités Na_v1 sont composées de 6 domaines transmembranaires et s'organisent en tétramère, chaque domaine (D) du tétramère étant relié au suivant par une boucle cytoplasmique. Entre les domaines II et III, se situe le motif d'interaction avec l'ankyrine G. Les canaux KCNQ2 et KCNQ3 sont aussi organisés en 6 domaines transmembranaires. Ils possèdent un longue région C-terminale, composée d'un domaine d'interaction avec les phospholipides membranaires (PIP2, pour *phosphatidylinositol4,5-biphosphate*), de deux domaines d'interaction avec la calmoduline (en violet), d'un domaine de tétramérisation (SID, pour *subunit interaction domain*) et d'un motif d'interaction avec l'ankyrine G (Adapté de Cooper et al., 2011).

Les molécules d'adhésion de la superfamille L1-CAM et leur interaction avec l'ankyrine ont été décrites dans la partie II (cf p.57).

b) Le segment initial de l'axone

Au niveau du **segment initial de l'axone**, les canaux Na_v font partie de complexes protéiques similaires à ceux retrouvés au niveau des nœuds, comprenant les canaux potassiques KCNQ2-KCNQ3, les molécules d'adhésion NrCAM et NF186 associés au cytosquelette grâce à l'ankyrine G et la spectrine βIV (Figure 59). Les molécules brevican et versican font partie de la matrice extracellulaire. De manière interessante, les complexes protéiques décrits au juxtaparanœud, composés des protéines TAG-1, Caspr2, ADAM22, des canaux K_v et des protéines d'échaffaudage 4.1B, PSD-93 et PSD-95, sont également présents au segment initial (Rasband, 2011). Ces complexes seraient préférentiellement localisés dans la partie distale du segment initial (Van Wart et al., 2007) (Figure 59).

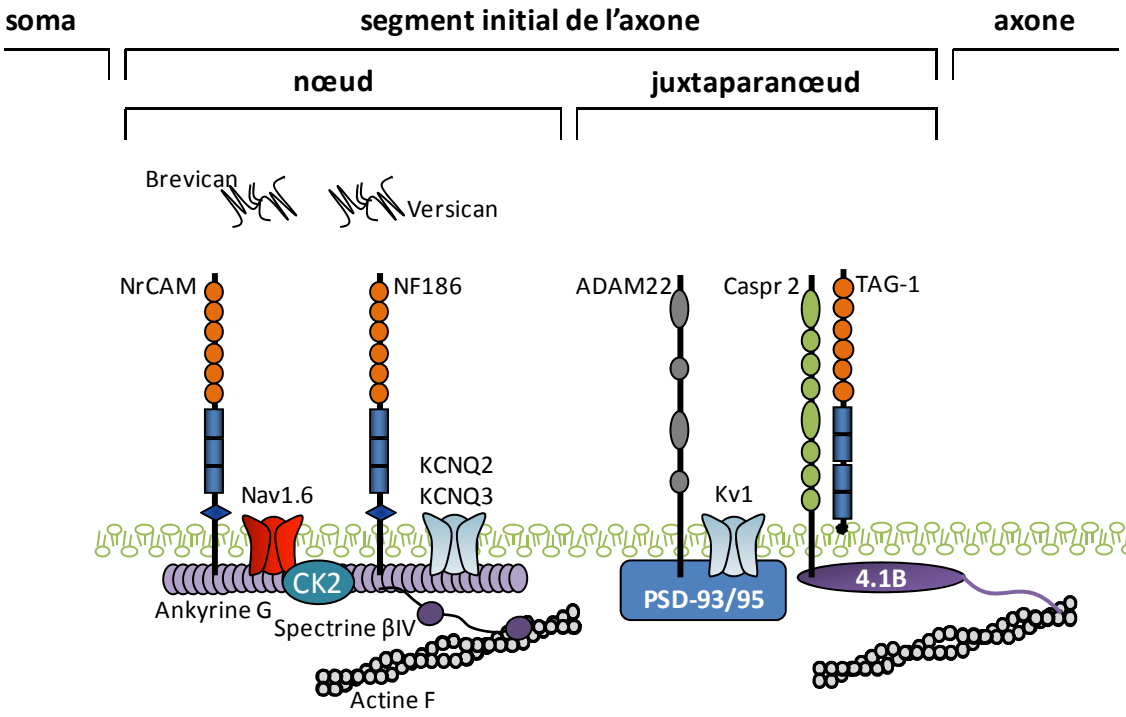


Figure 59 | Organisation moléculaire simplifiée du segment initial de l'axone. Les protéines des complexes protéiques identifiés au nœud et au juxtaparanœud sont retrouvées au segment initial (Adapté de Rasband, 2011).

c) Développement du nœud de Ranvier et du segment initial de l'axone

Le développement du nœud de Ranvier est directement dépendant des contacts axogliaux, alors que le segment initial se développe grâce à des mécanismes intrinsèques à l'axone.

(i) Le nœud de Ranvier

L'étude de souris mutées pour les protéines des complexes des nœuds et des paranœuds soutient l'hypothèse selon laquelle deux mécanismes, dépendant de la matrice extracellulaire et dépendant de la barrière paranodale, agiraient de concert pour permettre la formation du nœud de Ranvier du SNP (Faivre-Sarrailh and Devaux, 2013; Rasband, 2011).

Le modèle actuellement reconnu serait le suivant : les protéines d'adhésion CAMs de l'axone interagiraient avec les protéines de la matrice extracellulaire dérivées des cellules gliales et/ou avec les CAMs exprimées par les cellules gliales. Ces protéines gliales positionneraient et stabiliseraient les CAMs axonales dans des régions précises le long de l'axone. Les CAMs axonales recruteraient ensuite les protéines d'échaffaudage du cytosquelette qui interagiraient et stabiliseraient les canaux ioniques. La barrière de diffusion formée par les boucles paranodales participerait à la localisation et au confinement des canaux et autres protéines axonales dans des domaines précis (Faivre-Sarrailh and Devaux, 2013; Rasband, 2011) (Figure 60). Le mécanisme primordial au niveau du nœud serait la sécrétion de gliomedine et de NrCAM par les microvillosités des cellules de Schwann (Feinberg et al., 2010). Ces protéines de la

matrice extracellulaire interagissent avec les molécules d'adhésion NrCAM et NF186, exprimées par l'axone. NF186 et NrCAM seraient des sites de liaison pour l'ankyrine G, qui ensuite assemblerait les canaux ioniques et la spectrine βIV (Dzhashiashvili et al., 2007; Thaxton et al., 2011). En faveur de ce modèle, il a été observé que les protéines des nœuds de Ranvier du SNP s'assemblent correctement chez les souris n'exprimant pas la gliomedine ou n'exprimant pas NrCAM (Custer et al., 2003; Feinberg et al., 2010). Les mêmes observations sont rapportées chez les souris n'exprimant pas Caspr/paranodine qui présentent des défauts sévères dans les jonctions paranodales (Bhat et al., 2001). Les souris invalidées pour l'expression de la gliomedine et pour l'expression de Caspr/paranodine présentent quant à elles un défaut sévère dans la formation du nœud de Ranvier, soulignant l'importance des deux mécanismes pour la formation des nœuds de Ranvier (Feinberg et al., 2010).

Dans le SNC, le mécanisme dépendant de la barrière paranodale semble être le mécanisme primordial pour la formation des nœuds de Ranvier (Rasband et al., 1999). Les souris invalidées pour l'expression de Caspr/paranodine présentent une perte de l'enrichissement en canaux Na_v au nœud, qui sont relocalisés tout le long de l'axone (Rios et al., 2003). Les souris invalidées pour l'expression de NF155 et NF186 présentent également une perte de l'enrichissement en canaux Na_v. L'expression transgénique de NF155 dans les cellules gliales chez ces souris permet de restaurer l'accumulation de canaux Na_v au nœud (Zonta et al., 2008). Les mécanismes dépendant de la matrice extracellulaire restent peu connus dans ce contexte, mais pourrait faire intervenir le protéoglycan brevican qui interagit avec NF186 (Hedstrom et al., 2007).

L'**ankyrine G** et la **spectrine βIV**, qui ne seraient pas directement nécessaires à la formation des nœuds, joueraient un rôle important dans le maintien et la stabilisation des complexes moléculaires nodaux. L'ankyrine G permet le recrutement et la stabilisation de la spectrine βIV au nœud (Komada and Soriano, 2002; Yang et al., 2007). Chez les souris invalidées pour l'expression de la spectrine βIV, l'ankyrine G et les canaux Na_v sont toujours présents au nœud mais plus faiblement (Komada and Soriano, 2002; Uemoto et al., 2007). Deux isoformes de la spectrine βIV sont concentrées au nœud, l'isoforme 1 et l'isoforme 6. L'isoforme 1 serait responsable de la stabilisation de la membrane axonale. Les souris invalidées pour l'expression de cette isoforme présentent une augmentation du diamètre des nœuds et des dilatations membranaires remplies d'organelles dans ces régions (Lacas-Gervais et al., 2004). L'isoforme 6 aurait un rôle spécifique dans la stabilisation de l'ankyrine G et des canaux Na_v (Uemoto et al., 2007). L'étude des souris *qv^{3J}* (ou *quivering*), présentant une forte diminution de l'expression de la spectrine βIV, a permis de confirmer le rôle de la spectrine βIV dans l'intégrité structurale et dans l'organisation moléculaire des nœuds. Ces souris expriment une spectrine βIV délétée de sa région C-terminale, mais ayant toujours le domaine d'interaction à l'ankyrine G (Parkinson et al., 2001). Les nœuds du SNC sont très affectés chez ces souris : ils présentent des accumulations de canaux Na_v et d'ankyrine G plus étendues sur la fibre, des dilatations membranaires remplies de vésicules, ainsi qu'une morphologie axonale et une densité en neurofilaments fortement affectées (Yang et al., 2004). Les nœuds du SNP sont beaucoup moins affectés. Ces souris présentent en outre une absence de canaux KCNQ2 aux nœuds SNC et SNP (Devaux, 2010).

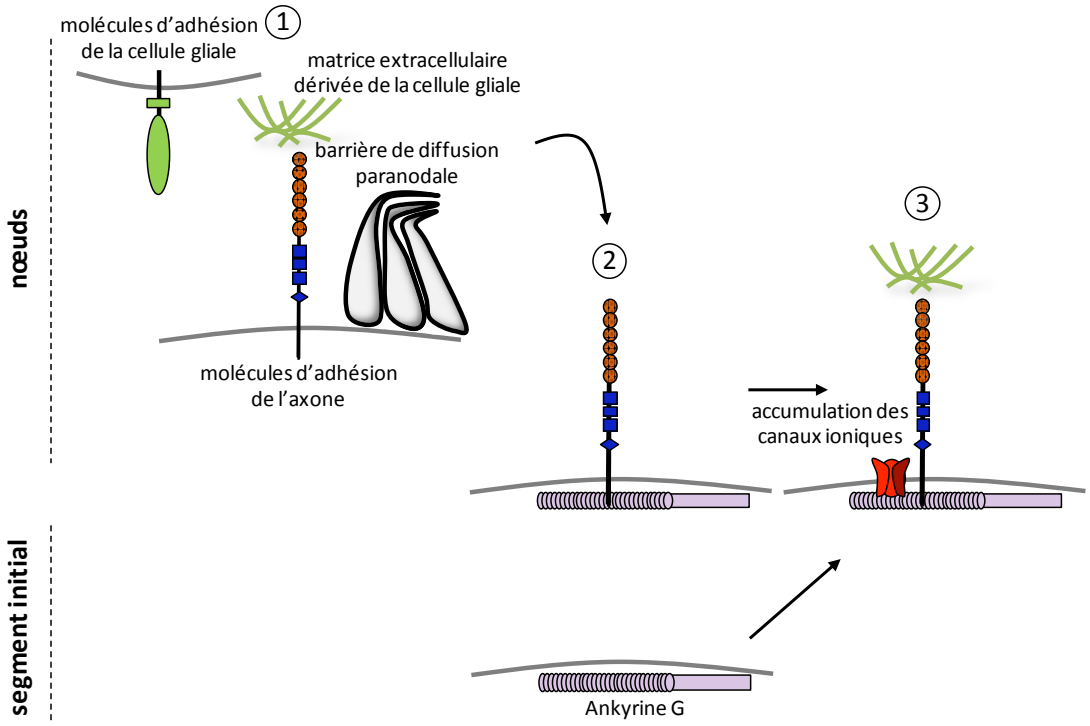


Figure 60 | Modèle de développement des nœuds périphériques et du segment initial de l'axone. Les nœuds du SNP se développent grâce aux interactions axogliales, alors que le développement du segment initial serait intrinsèque à l'axone. (1) Au niveau des nœuds, les molécules d'adhésion des cellules gliales, les protéines de la matrice extracellulaire dérivées des cellules gliales, et les jonctions paranodales interagissent avec et délimitent la position des molécules d'adhésion exprimées par l'axone. (2) Ces protéines de la famille CAMs permettent l'attachement de l'ankyrine G à la membrane. Au niveau du segment initial, l'ankyrine G est d'abord accumulée et recrute les molécules d'adhésion. (3) Les canaux ioniques sont ensuite concentrés et confinés dans ces domaines grâce à leur interaction avecl'ankyrine G. Au segment initial de l'axone, les protéines de la matrice extracellulaire sont également recrutées *via* leur interaction avec les CAMs (Adapté de Rasband, 2011).

(ii) Le segment initial de l'axone

La formation du **segment initial de l'axone** est indépendante des contacts axogliaux et repose sur des mécanismes intrinsèques à l'axone. Il a été observé que des neurones dissociés non myélinisés en culture peuvent développer des segments initiaux. L'ensemble des données actuelles établies *in vitro* et *in vivo* indiquent que l'ankyrine G serait la première protéine accumulée au segment initial et permettrait le recrutement des molécules d'adhésion NrCAM et NF186 et des canaux Na_v et KCNQ (Rasband, 2011) (Figure 60). Il a notamment été observé que des souris invalidées pour l'expression de l'ankyrine G dans le cervelet post-natal spécifiquement présentent une perte de l'enrichissement en canaux Na_v au segment initial des axones des neurones de Purkinje (Jenkins and Bennett, 2001). La spectrine βIV est absente et la neurofascine n'est plus restreinte au segment initial de l'axone (Jenkins and Bennett, 2001). Ces souris présentent une forte ataxie et une perte de la capacité à émettre des potentiels d'action.

Les mécanismes en amont du recrutement de l'ankyrine G au segment initial de l'axone sont peu connus. Cependant des études récentes *in vitro* et *in vivo* proposent que l'accumulation de l'ankyrine G au segment initial résulterait d'un phénomène d'exclusion plutôt que d'un recrutement par d'autres protéines. Ce phénomène reposerait sur la mise en place, dans l'axone distal, d'un cytosquelette d'**ankyrine B** et de **spectrines αII et βII** au cours du développement. Ce cytosquelette définirait une frontière intra-axonale, restreignant l'**ankyrine G** dans la partie proximale de l'axone qui deviendra le segment initial de l'axone (Figure 61) (Galiano et al., 2012).

In vitro, les neurones d'hippocampe en culture présentent plusieurs stades de développement : à partir du stade 1 où les neurones ne présentent que des lamellipodes, les neurones forment ensuite des neurites au stade 2. Au stade 3, un des neurites va pousser plus vite et acquérir des propriétés axonales, les autres neurites continuent de pousser plus lentement et deviendront les dendrites au stade 4 (Barnes and Polleux, 2009) (Figure 61). Dans ces cultures, l'ankyrine G n'est pas nécessaire à la spécification initiale de l'axone (Galiano et al., 2012). Le segment initial se développe entre les stades 3 et 4. L'enrichissement en ankyrine G de la partie proximale de l'axone n'est visible qu'à partir de 4 jours en culture. Il a été montré qu'après la spécification de l'axone, un cytosquelette composé d'ankyrine B, de spectrine αII et de spectrine βII s'assemble dans la partie distale de l'axone et l'envahit progressivement vers la région proximale. Ce cytosquelette distal permet à l'ankyrine G, exprimée plus tardivement, de s'accumuler dans la partie proximale de l'axone et de former le segment initial. La suppression *in vitro* d'une des protéines de ce cytosquelette distal empêche la formation de la frontière intra-axonale et conduit à une localisation de l'ankyrine G dans l'axone distal (Galiano et al., 2012).

L'importance du cytosquelette de spectrines αII/βII dans l'enrichissement en l'ankyrine G du segment initial de l'axone a été renforcée *in vivo* par l'étude des souris invalidées pour l'expression de la spectrine αII ou pour l'expression de la spectrine βII. Ces souris présentent un segment initial fragmenté et des puncta d'ankyrine G sont retrouvés dans l'axone distal. Cependant, les souris invalidées pour l'expression de l'ankyrine B présentent un segment initial normal, contrairement aux données *in vitro*. Cette différence pourrait reposer sur des mécanismes de compensation extrinsèques ayant lieu *in vivo* (Galiano et al., 2012).

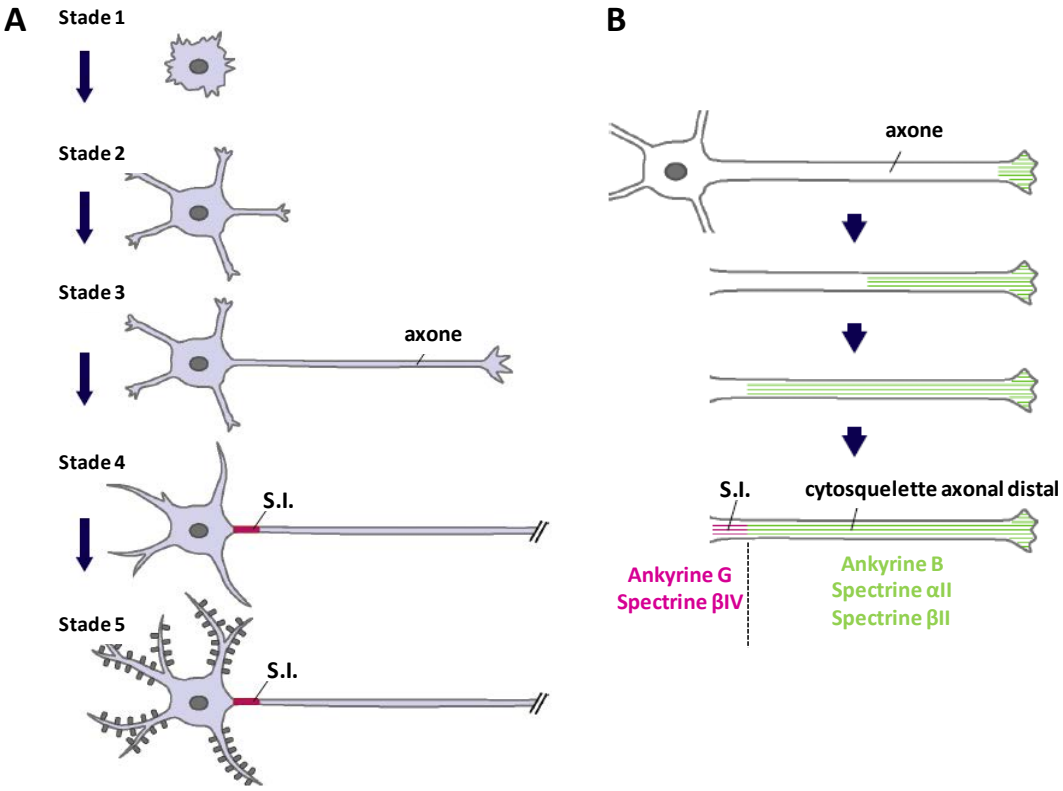


Figure 61 | Développement du segment initial de l'axone. ***A***, Etablissement de la polarité neuronale d'un neurone en culture. La première étape de polarisation est l'initiation axonale, entre les stades 2 et 3. Le segment initial de l'axone (S.I.) se forme entre les stades 3 et 4. Le S.I. permet de maintenir la polarité neuronale et régule l'initiation des potentiels d'action. ***B***, Formation du S.I. au cours du développement. Après la spécification de l'axone, le cytosquelette d'ankyrine B/spectrine αII/spectrine βII (en vert) s'assemble dans la partie distale de l'axone et envahit progressivement l'axone vers le corps de la cellule. Ce cytosquelette distal permet à l'ankyrine G, exprimée plus tardivement, de s'accumuler dans la partie proximale de l'axone et de former le segment initial de l'axone (Adapté de Yoshimura and Rasband, 2014).

3. IQCJ-SCHIP-1 est recrutée tardivement au nœud de Ranvier et au segment initial de l'axone

Le laboratoire a montré que l'isoforme de SCHIP-1, **IQCJ-SCHIP-1**, est concentrée aux nœuds et au segment initial de l'axone, où elle co-localise avec les canaux Na_v et avec l'ankyrine G (Martin et al., 2008) (Figure 62).

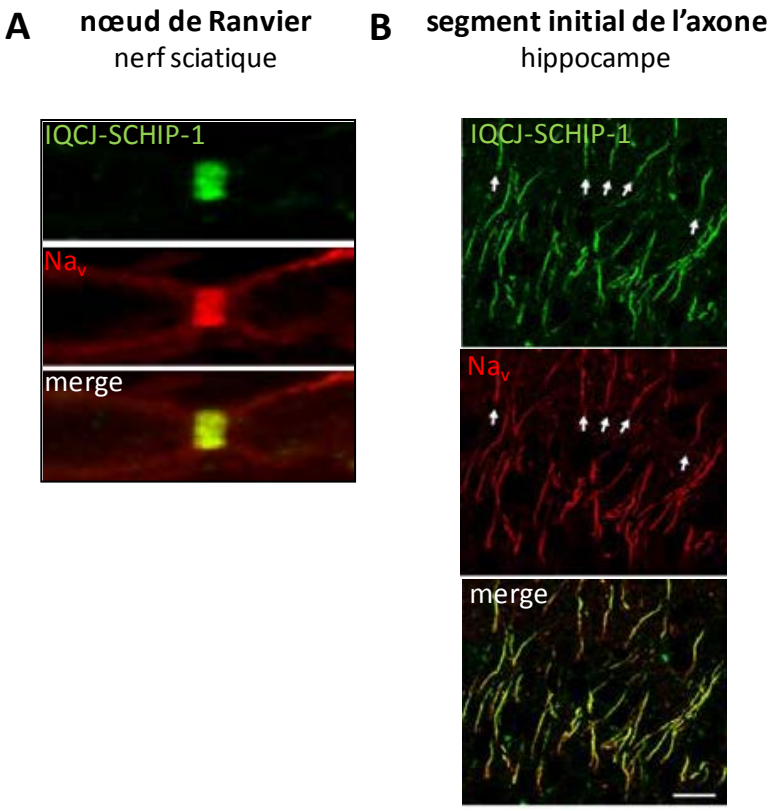


Figure 62 | Localisation de IQCJ-SCHIP-1 au nœud et au segment initial de l'axone. ***A***, Localisation de IQCJ-SCHIP-1 au nœud d'une fibre de nerf sciatique, co-localisation avec les canaux Na_v. ***B***, Localisation de IQCJ-SCHIP-1 au segment initial de l'axone des neurones de l'hippocampe (flèches), co-localisation avec les canaux Na_v (Adapté de Martin et al., 2008).

La protéine IQCJ-SCHIP-1 est un composant tardif du nœud et du segment initial de l'axone par rapport aux canaux Na_v ou à l'ankyrine G, et n'apparaît donc pas nécessaire pour la formation de ces structures spécialisées. Des immunomarquages de coupes de nerfs sciatiques au cours du développement ont en effet montré que l'enrichissement en IQCJ-SCHIP-1 du nœud est postérieur à l'enrichissement en canaux Na_v (Martin et al., 2008) (Figure 63). Alors qu'à 6 jours après la naissance (P6), IQCJ-SCHIP-1 co-localise avec les canaux Na_v dans tous les nœuds du nerf sciatique de rat, à P0 seuls quelques nœuds présentent un marquage pour IQCJ-SCHIP-1 (Figure 63). De plus, IQCJ-SCHIP-1 est absente des nœuds en formation (hémi-nœuds), où les canaux Na_v sont déjà accumulés (Figure 63). Par ailleurs, l'enrichissement en IQCJ-SCHIP-1 au segment initial de l'axone de neurones d'hippocampe en culture n'est visible que dans 45% des

neurones après 6 jours en culture, alors que 90% des neurones présente déjà une concentration de l'ankyrine G au même stade (Figure 63).

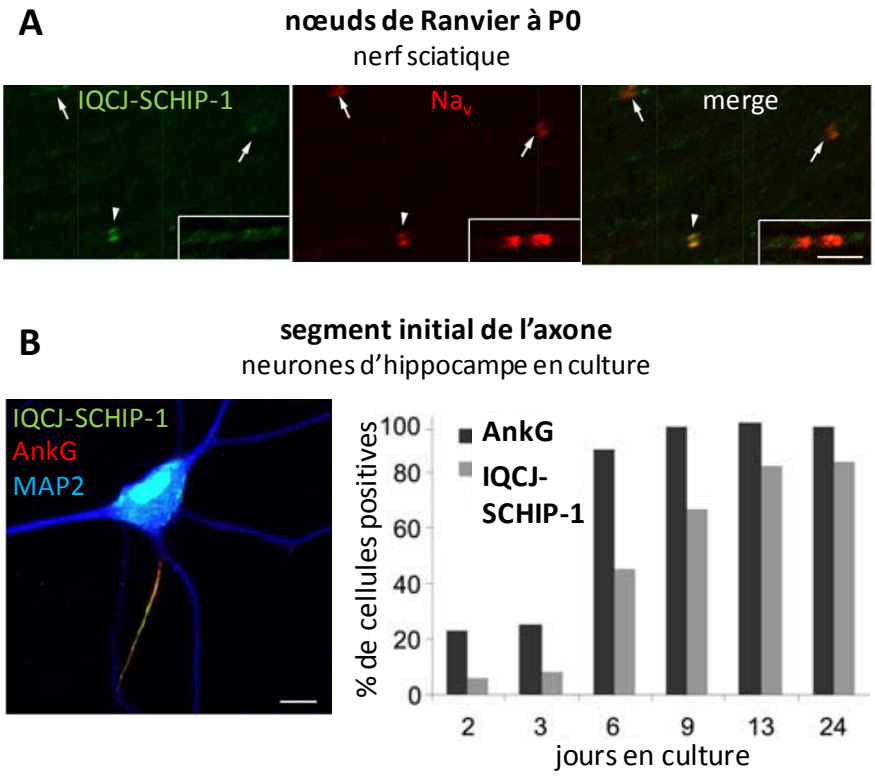


Figure 63 | L'enrichissement en IQCJ-SCHIP-1 des nœuds et du segment initial de l'axone apparaît après l'enrichissement en canaux Na_v et en ankyrine G. ***A***, Nerf sciatique de rat à P0. IQCJ-SCHIP-1 n'est visible que dans quelques nœuds (tête de flèche) mais pas dans la majorité (flèches). IQCJ-SCHIP-1 est absente des hémi-nœuds (encadré). ***B***, Localisation de IQCJ-SCHIP-1 au segment initial de l'axone d'un neurone d'hippocampe mature après 23 jours en culture, co-localisation avec l'ankyrine G (AnkG). L'anticorps anti-MAP2 (bleu) permet de visualiser les dendrites et le soma des neurones. A droite, pourcentage de neurones avec un segment initial positif pour IQCJ-SCHIP-1 (gris) et pour l'ankyrine G (AnkG, noir) à différents stades de culture (Adapté de Martin et al., 2008).

4. SCHIP-1 interagit avec les protéines du cytosquelette cortical

Le laboratoire a montré que SCHIP-1 interagit avec les ankyrines B et G (Martin et al., 2008 ; collaboration avec Bénédicte Dargent) et la spectrine βIV (Article annexe 1). Les **ankyrines** et les **spectrines** sont connues pour avoir un rôle de stabilisation des domaines membranaires dans de nombreux types cellulaires (Bennett and Healy, 2009).

Chez les Vertébrés, les ankyrines sont codées par 3 gènes différents : l'**ankyrine R** (ANK1), d'abord caractérisée dans les érythrocytes mais aussi présente de manière restreinte dans le cerveau et le muscle, l'**ankyrine B** (ANK2) et l'**ankyrine G** (ANK3), qui sont co-exprimées dans la plupart des types cellulaires, mais ont des fonctions distinctes. Plusieurs isoformes résultent

de l'épissage alternatif de ces gènes, chaque ankyrine étant représentée par des protéines de poids moléculaires différents. Dans le cerveau, l'ankyrine B est fortement exprimée dans les axones non myélinisés et au cours de stades précoces de développement axonal (Chan et al., 1993).

Les **ankyrines** présentent un domaine N-terminal d'interaction à la membrane composé de 24 répétitions ANK, appelé MBD (pour *membrane binding domain*) (Figure 64). Les répétitions ANK sont des motifs d'acides aminés présents dans diverses protéines, qui adoptent une conformation en hélices α antiparallèles s'organisant en spirale superhélicoïdale. Ces motifs sont connus pour leur fonction de reconnaissance protéique et permettent l'interaction des ankyrines avec leurs partenaires membranaires (Bennett and Baines, 2001) (Figure 64). L'ankyrine possède un domaine d'interaction avec la spectrine β constitué de feuillets β, appelé ZU5-ANK (Ipsaro et al., 2009). Le domaine C-terminal de l'ankyrine comprend un domaine de mort et un région C-terminale dont les fonctions ne sont pas connues. Les domaines d'association à la membrane, à la spectrine, le domaine de mort et le domaine C-terminal sont retrouvés dans la majorité des ankyrines. Les ankryrines B et G de hauts poids moléculaires présentent un domaine, appelé *tail domain,* localisé entre le domaine d'interaction à la spectrine et le domaine de mort. L'ankyrine G possède en plus un domaine riche en sérines/thréonines juste après son domaine d'interaction à la spectrine (Mohler et al., 2002) (Figure 64).

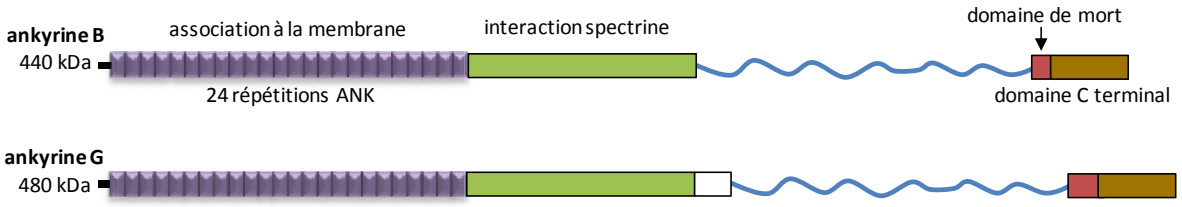


Figure 64 | Domaines structuraux des ankyrines B et G. Le domaine riche en sérines/thréonines de l'ankyrine G est représenté par un rectangle blanc, le domaine de queue est en bleu (Adapté de Mohler et al., 2002).

Les **spectrines** sont composées de deux sous-unités, α et β, qui s'assemblent de manière anti-parallèle pour former des hétérodimères, qui à leur tour vont s'associer « tête-bêche » et former des tétramères (Davis and Bennett, 1983; Shotton et al., 1979) (Figure 65). Les sous-unités α sont composées de répétitions de motifs spectrine séparées par un domaine d'homologie avec le domaine Src 3 (SH3) (Musacchio et al., 1992; Speicher and Marchesi, 1984). Leur région C-terminale présente un domaine d'interaction au calcium (Trave et al., 1995). La spectrine αII présente un domaine spécifique d'interaction avec la calmoduline (Simonovic et al., 2006). Les spectrines β sont composées d'un domaine N-terminal d'interaction avec les protéines 4.1 et avec l'actine, puis de répétitions de motifs spectrine (Banuelos et al., 1998). Leur région C-terminale est composée d'un domaine d'homologie avec la pleckstrine (PH, pour *pleckstrin homology*) permettant l'interaction avec les phosphoinositols. La spectrine βIV présente en outre un domaine riche en prolines, dit « spécifique » (SD, pour *« specific » domain*), dont la fonction n'est pas connue (Bennett and Healy, 2009). Les sites d'interaction des spectrines βI-IV

avec l'ankyrine sont localisés dans les 14ème et 15ème répétitions du motif spectrine (Ipsaro et al., 2009; Stabach et al., 2009).

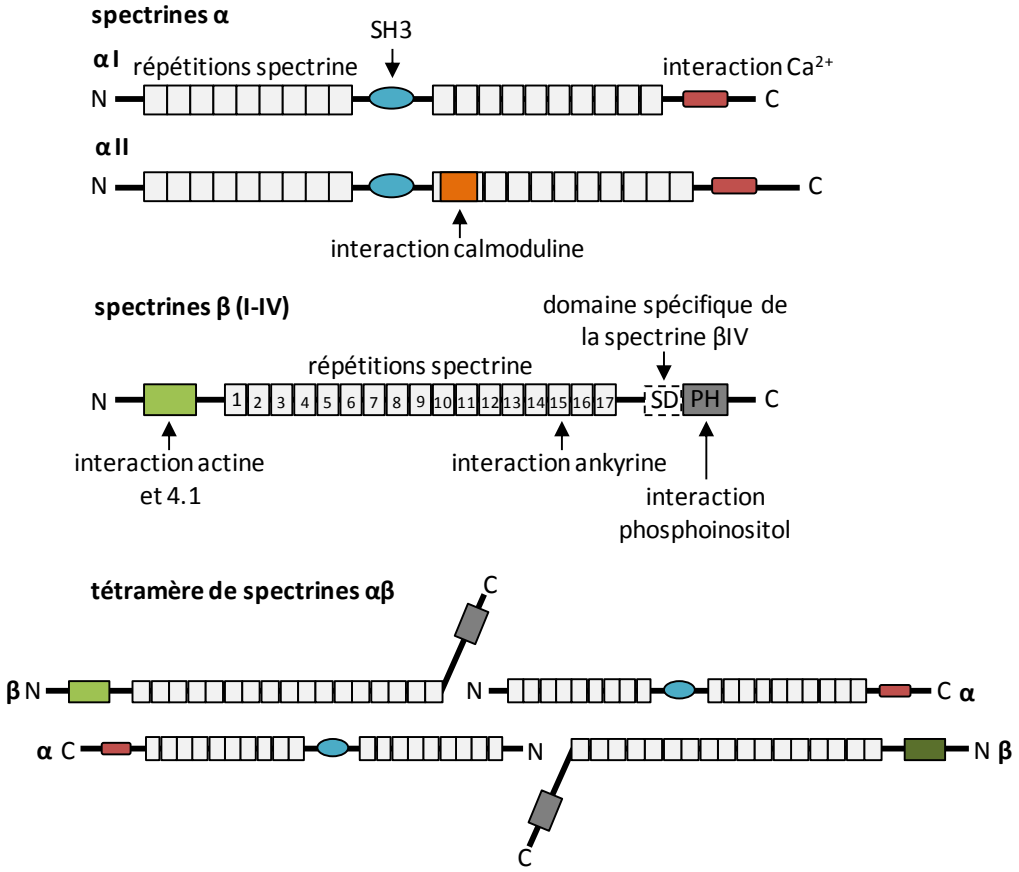


Figure 65 | Domaines structuraux des spectrines et formation des tétramères. Les spectrines α et β forment des tétramères par l'association de paires de dimères (αβ). A chaque extrémité du tétramère de spectrines se trouve un domaine d'interaction avec l'actine dans la partie N-terminale de la spectrine β (Adapté de Bennett and Healy, 2009).

La localisation de IQCJ-SCHIP-1 au segment initial de l'axone et aux nœuds est dépendante de l'ankyrine G et de la spectrine βIV. Chez les souris invalidées pour l'expression de l'ankyrine G dans le cervelet (Zhou et al., 1998), IQCJ-SCHIP-1 n'est pas concentrée aux segments initiaux des cellules de Purkinje (Martin et al., 2008). Chez les souris mutées *quivering* qv_{3J} présentant une perte de la spectrine βIV, l'enrichissement en IQCJ-SCHIP-1 aux segments initiaux des neurones du cortex est perdu, alors que l'enrichissement en canaux Na_v est toujours visible. L'enrichissement en IQCJ-SCHIP-1 aux nœuds du nerf optique est également perdu (Martin et al., 2008). Dans le SNP, l'enrichissement en IQCJ-SCHIP-1 des nœuds est perdu à 6 mois, même s'il peut être visible dans certains cas à 2 mois (Martin et al., 2008).

Des expériences de GST *pull-down* ont montré que SCHIP-1 interagit directement avec le domaine conservé MBD des **ankyrines** (Martin et al., 2008) (Figure 66). Par ailleurs, SCHIP-1 interagit également avec la région C-terminale de la **spectrine βIV**, interaction montrée par des expériences de co-immunoprécipitation sur des lysats de cellules COS7 surexprimant les

protéines (Article annexe 1, Figure 7). De manière intéressante, au sein de la spectrine βIV le domaine d'interaction avec SCHIP-1 est différent du domaine d'interaction avec l'ankyrine G. Dans les deux cas, la région C-terminale de SCHIP-1 contenant le motif *leucine zipper* est nécessaire pour les interactions. Il reste cependant à élucider si cette région est directement impliquée dans ces interactions ou si elle permet l'homodimérisation de SCHIP-1 qui serait nécessaire pour ces interactions.

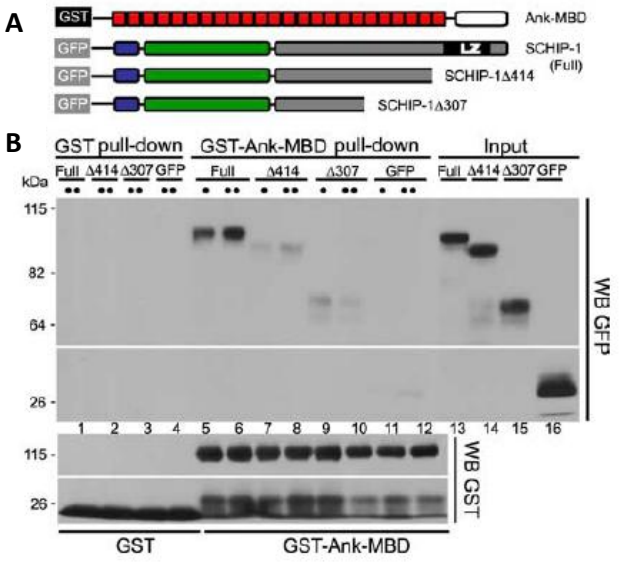


Figure 66 | Le domaine C-terminal de SCHIP-1 interagit avec le domaine MBD de l'ankyrine. Expériences de GST *pull-down* réalisées avec une construction comprenant le domaine MBD de l'ankyrine fusionné à la GST et des lysats de cellules COS exprimant la protéine SCHIP-1a sauvage ou mutée fusionnée à la GFP. ***A***, Constructions utilisées pour les expériences de GST *pull-down* : la GST-Ank-MBD contient le motif conservé MBD des ankyrines (en rouge) ; les protéines SCHIP-1a entière (*full*), SCHIP-1aΔ414 et SCHIP-1aΔ307 (délétées des 73 et 180 acides-aminés de la partie C-terminale respectivement) sont fusionnées à la GFP. ***B***, La GST-Ank-MBD (puits 5 à 12) mais pas la GST seule (puits 1 à 4) précipite SCHIP-1a entière (*full*, puits 5 à 6) mais pas les formes de SCHIP-1a tronquées de leur région C-terminale (puits 7 à 10) ou la GFP seule (puits 11-12) (Adapté de Martin et al., 2008).

C. Souris invalidées pour l'expression de SCHIP-1

1. Génération des souris *Schip1*Δ10

Afin de mieux appréhender la fonction de SCHIP-1, des souris mutées pour le gène *Schip1* ont été générées au laboratoire par délétion de l'exon 10 du gène (souris *Schip1*Δ10), grâce à une stratégie de recombinaison homologue à trois sites lox*P* (Kulkarni et al, 2002) (Figure 67, *A*). L'exon 10 correspond au 2ème exon de la partie 3' commune à toutes les isoformes (cf. Figure 51, p. 89). Cette délétion était prédite pour entraîner un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré (Figure 67), permettant d'altérer l'expression de toutes les isoformes et de générer des protéines délétées des 194 résidus de leur région C-terminale comprenant la région d'oligomérisation et d'interaction avec l'ankyrine. Des expériences de RT-PCR ont permis d'identifier la présence de faibles niveaux d'ARNm correspondant aux isoformes délétées de l'exon 10, mais également à des isoformes délétées des exons 10-11 et des exons 10-11-12, dans le cerveau en développement et adulte (Figure 67). Des expériences d'immunoprécipitation suivies de western blot ont permis de montrer la disparition de la protéine SCHIP-1 sauvage mais n'ont pas révélé les isoformes tronquées (Artcile annexe 1, Figure 1*F*). Cependant, des immunomarquages avec des anticorps spécifiques reconnaissant la région N-terminale de l'isoforme IQCJ-SCHIP-1 ont montré que les protéines tronquées correspondant à cette isoforme sont présentes au niveau des nœuds des fibres myélinisées périphériques des souris mutées (Article annexe 1, Figure 5*A*, *B*). Les protéines tronquées n'ont plus le domaine d'oligomérisation et d'interaction avec l'ankyrine G et la spectrine βIV, et seraient donc maintenues au nœud par des interactions faisant intervenir leur région N-terminale.

Les souris *Schip1*Δ10 sont viables et fertiles mais plus petites que les souris sauvages (WT). Le prélèvement d'embryons chez des femelles hétérozygotes pour la mutation accouplées avec des mâles hétérozygotes a permis de montrer que le ratio des génotypes WT, hétérozygotes et homozygotes pour la mutation est mendélien à E14.5 et E16.5 (Figure 68). Par contre, au sevrage, la proportion de souris *Schip1*Δ10 par portée est fortement diminuée (Figure 68). Ceci suggère une augmentation de la mortalité des animaux mutés *Schip1*Δ10 soit tardivement au cours du développement embryonnaire soit après la naissance.

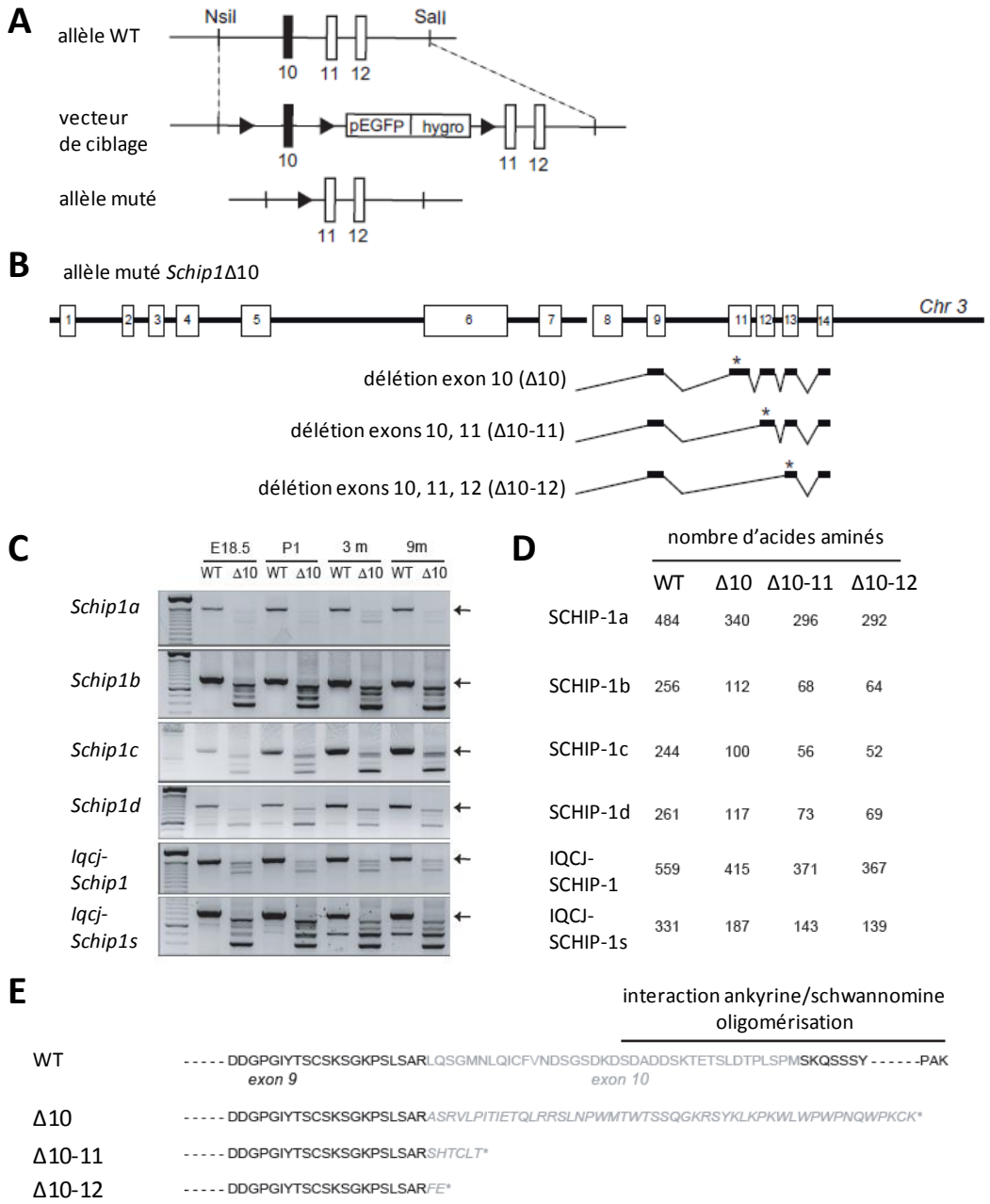


Figure 67 | Génération des souris *Schip1*Δ10. ***A***, Stratégie de recombinaison tri-lox et délétion de l'exon 10 du gène *Schip1*. Les exons 10, 11 et 12 de l'allèle sauvage (WT) sont représentés en haut. Au milieu, est représenté le vecteur de ciblage, avec les 3 sites lox*P* (têtes de flèche noires) de chaque côté de l'exon 10 et de la cassette de sélection *PGK*Hygromycine/GFP (pEGFP/hygro). En bas, est représenté l'allèle muté obtenu après recombinaison par la Cre *in vivo*. ***B***, L'allèle muté *Schip1*Δ10 conduit à l'expression d'isoformes délétées de l'exon 10 (Δ10), mais aussi d'isoformes délétées des exons 10, 11 (Δ10-11) et des exons 10, 11, 12 (Δ10-12). Les astérisques représentent les codons stop. ***C***, RT-PCR réalisées sur cerveaux à E18.5, P1, 3 et 9 mois permettant d'identifier des fragments d'ADN correspondant aux transcrits délétés d'un, de deux ou de trois exons chez les animaux *Schip1*Δ10. A tous les âges et pour toutes les isoformes, le transcrit WT est absent (flèches). ***D***, Nombre d'acides aminés des isoformes putatives de SCHIP-1 WT, Δ10, Δ10-11 et Δ10-12 tronquées. ***E***, Séquence protéique prédite de la région conservée C-terminale de la protéine SCHIP-1 WT, Δ10, Δ10-11 et Δ10-12. Dans tous les cas, la région d'oligomérisation et d'interaction avec l'ankyrine et la schwannomine est perdue.

Age	E14.5		E16.5		Weaning time	
Genotype	Total number	%	Total number	%	Total number	%
WT	63	26.9	19	23.2	218	35.4
HET	105	44.9	42	51.2	314	51
Δ10	66	28.2	21	25.6	83	**13.6**
p value	0.477		0.928		**<0.0001**	

Figure 68 | Proportions d'animaux par génotype au cours du développement. Les portées de parents hétérozygotes présentent un ratio de génotypes mendélien aux stades embryonnaires E14.5 et E16.5. Lors du sevrage, la proportion en animaux homozygotes (Δ10) pour la mutation diminue fortement (Article annexe 1).

2. Les souris mutées *Schip1*Δ10 présentent des anomalies morphologiques des nœuds de Ranvier du SNP

L'observation des souris mutées *Schip1*Δ10 dans leur cage a montré qu'elles présentent des comportements stéréotypés : elles sautent sur place de manière répétée et battent des pattes arrière lorsqu'elles sont suspendues par la queue.

Par ailleurs, ces souris présentent des anomalies motrices et sensorielles suggérant des défauts des nerfs périphériques (Article annexe 1, Figure 2). Des tests de marche (*footprint*), de coordination motrice (*grid test*) ou de résistance à la température (*hot plate*) ont en effet montré un certain degré d'ataxie et suggèrent une altération de la nociception chez ces souris. De plus, des altérations des fibres myélinisées périphériques ont pu être observées. Les souris mutées *Schip1*Δ10 présentent d'une part une faible altération de la conduction du potentiel d'action (Article annexe 1, Figure 3). D'autre part, le nombre de fibres par nerf et le diamètre des axones semblent diminués tandis que l'épaisseur de la myéline est augmentée (Article annexe 1, Figure 4).

Des immunomarquages ont montré que les protéines majeures des complexes décrits précédemment sont présentes dans les nœuds de Ranvier des souris mutées. Les canaux Na_v et KCNQ2, NrCAM et NF186, l'ankyrine G et la spectrine βIV sont concentrés au nœud (Article annexe 1, Figure 5*D*). Les protéines Caspr/paranodine et contactine-1/F3 sont concentrées au paranœud, et les canaux K_v1 sont présents au juxtaparanœud (Article annexe 1, Figure 5*C*, *D*). Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle IQCJ-SCHIP-1 ne serait pas nécessaire à la formation du nœud. Cependant, les souris mutées présentent des anomalies morphologiques des nœuds, qui sont plus épais et moins longs (Figure 69 ; Article annexe 1, Figure 5*F*).

RESULTATS

I. ARTICLE

SCHIP-1 est impliquée dans le guidage axonal et nécessaire au développement du cortex piriforme et de la commissure antérieure.

SCHIP-1 est impliquée dans le guidage axonal et nécessaire au développement du cortex piriforme et de la commissure antérieure

SCHIP-1 *is involved in axon guidance and required for piriform cortex development and anterior commissure formation*

Esther Klingler, Pierre-Marie Martin, Marta Garcia, Caroline Moreau-Fauvarque, Julien Falk, Alain Chédotal, Jean-Antoine Girault, Laurence Goutebroze.

L'expression de *Schip1* à partir du stade embryonnaire E12.5 dans le cerveau de souris indiquait que SCHIP-1 pouvait présenter des fonctions neuronales spécifiques au cours du développement. L'objectif de mon travail, présenté ici, a été d'appréhender ces fonctions sur la base de la caractérisation des défauts anatomiques majeurs détectables au niveau du cerveau de souris mutées *Schip1*Δ10.

L'analyse morphologique des cerveaux des souris adultes a montré que les principales structures cérébrales sont conservées chez les souris *Schip1*Δ10, mais que celles-ci présentent des anomalies de substance blanche, au niveau du corps calleux et de la commissure antérieure (CA). L'épaisseur du corps calleux à la ligne médiane est réduite dans les régions caudales du cerveau des souris mutées comparées aux souris sauvages (WT), suggérant un nombre réduit d'axones commissuraux dans le néocortex. Les anomalies au niveau la commissure antérieure sont plus sévères : les souris mutées présentent une forte réduction de la branche antérieure et une absence de la branche postérieure. Les défauts de fibres sont visibles dès les stades précoces du développement de la CA, à partir de E13.5. Au stade embryonnaire E16.5, alors que la CA est établie chez les embryons WT, les axones de la branche antérieure n'atteignent pas la ligne médiane chez les embryons mutés et les rares axones de la branche postérieure restent dans les régions accolées au cortex au lieu de projeter vers la ligne médiane. Ces résultats montrent un défaut de croissance des axones de la CA, et suggèrent un défaut additionnel de guidage des axones de la branche postérieure.

La sévérité des défauts observés au niveau de la CA m'a conduite à déterminer si le cortex piriforme, source principale des axones de la CA, présentait également des anomalies chez les souris mutées. L'organisation en trois couches du cortex piriforme est préservée. Cependant, l'épaisseur des couches de neurones pyramidaux est diminuée, de façon plus prononcée dans les régions caudales du cerveau. Cette diminution d'épaisseur est visible à partir du stade embryonnaire E16.5. La génération et la migration précoce des cellules pyramidales du cortex piriforme ne semblent pas être affectées. Par contre, une augmentation de la mort cellulaire à

E14.5 a pu être observée et pourrait contribuer à la diminution d'épaisseur visible à E16.5. Les souris mutées présentent en outre des anomalies de comportements qui pourraient être associées à des défauts d'intégration des odeurs « sociales » au sein du cortex piriforme.

Le développement de la CA repose sur l'expression de récepteurs aux molécules de guidage par les neurones du cortex piriforme d'une part, et sur l'expression des molécules de guidage par les structures situées autour de la « route » empruntée par les axones d'autre part (Falk et al., 2005; Henkemeyer et al., 1996; Ho et al., 2009; Sahay et al., 2003). Afin de déterminer l'origine des défauts observés chez les souris mutées, le profil d'expression de *Schip1* au cours du développement a été établi. Des expériences d'hybridation *in situ* ont montré que *Schip1* est exprimé dès E13.5 et jusqu'à P0 au niveau du cortex piriforme, du noyau olfactif antérieur et de l'amygdale, mais également au niveau du striatum, du thalamus et de la zone sous-ventriculaire, suggérant que les défauts de la CA pourraient être la conséquence de l'absence d'expression de SCHIP-1 dans les neurones du cortex piriforme (fonction « cellule autonome » de SCHIP-1) ou dans les structures voisines au cortex piriforme connues pour jouer un rôle dans le développement des axones de la CA.

Afin de comprendre le rôle « cellule autonome » de SCHIP-1 aux stades précoces de développement de la CA, j'ai mis au point des cultures de neurones dissociés de cortex piriforme à E14.5, stade auquel les axones de la CA poussent activement. Aucune mort cellulaire n'a été observée dans les cultures établies à partie d'embryons mutés suggérant que l'absence de SCHIP-1 *per se* n'induit pas directement la mort des neurones du cortex piriforme, et que l'augmentation de la mort cellulaire observée *in vivo* reposerait sur des facteurs extrinsèques. L'analyse comparative de la morphologie des neurones d'embryons mutés et d'embryons WT à différents stades en culture a montré que les neurones mutés présentent un retard d'initiation et d'élongation axonales, suggérant un rôle de SCHIP-1 dans ces mécanismes.

Le striatum est la première structure traversée par les axones du cortex piriforme lorsqu'ils projettent vers la ligne médiane. Il exprime des molécules de guidage importantes pour le développement de la CA, comme la sémaphorine 3F (Sahay et al., 2003) ou EphB2 (Henkemeyer et al., 1996). Afin d'investiguer un rôle potentiel de SCHIP-1 dans la réponse des axones du cortex piriforme aux molécules de guidage, j'ai réalisé des expériences de co-culture d'explants de cortex piriforme avec des explants de striatum, au stade embryonnaire E14.5. Ces expériences ont montré que le striatum a une action répulsive sur les axones du cortex piriforme antérieur mais n'affecte pas la croissance des axones du cortex piriforme postérieur des embryons WT. Chez les embryons mutés, cette différence est abolie, le striatum ayant une action répulsive sur les axones des deux régions du cortex piriforme. Ce phénotype révèle une réponse anormale des axones du cortex piriforme postérieur aux molécules de guidage répulsives sécrétées par le striatum à E14.5, et démontre un rôle de SCHIP-1 dans le guidage des axones du cortex piriforme postérieur.

La molécule de guidage répulsive EphB2 est connue pour jouer un rôle dans le développement de la CA, *via* une voie de signalisation inverse impliquant l'ephrine B2 exprimée par les axones de la CA (Cowan et al., 2004; Henkemeyer et al., 1996; Ho et al., 2009). Il a été montré que la

partie extracellulaire d'EphB2 est suffisante pour induire la collapse des cônes de croissance exprimant l'ephrine B (Mann et al., 2003). J'ai étudié la réponse des axones des neurones du cortex piriforme à cette molécule répulsive, afin de caractériser davantage le rôle de SCHIP-1 dans le guidage. Des immunomarquages sur les cultures fixées ont montré que la proportion de cônes de croissance collapsés est maximum et similaire dans les cultures de neurones WT et mutés après 10 minutes d'incubation en présence d'EphB2. Cette proportion diminue après 30 minutes d'incubation dans les cultures de neurones WT mais reste inchangée dans les cultures de neurones mutés. Parallèlement, les cônes de croissance collapsés des neurones WT présentent moins d'agrégats d'EphB2 à la membrane à 30 minutes qu'à 10 minutes d'incubation avec l'EphB2, alors que la quantité d'EphB2 à la membrane des cônes de croissance des neurones mutés ne varie pas au cours de l'incubation. Des expériences de vidéo-microscopie ont par ailleurs montré que les cônes de croissance des neurones WT développent à nouveau des filopodes et des lamellipodes après avoir collapsé alors que les cônes de croissance des neurones mutés restent collapsés. L'ensemble de ces observations suggère que les neurones mutés présentent un défaut d'adaptation à la molécule de guidage répulsive EphB2, qui pourrait résulter d'un défaut d'internalisation de ses récepteurs au niveau des cônes de croissance.

En conclusion, l'ensemble de cette étude a permis de montrer que SCHIP-1 joue un rôle important dans le développement du cerveau chez la souris. Les souris *Schip1*Δ10 présentent une diminution de l'épaisseur du cortex piriforme et des défauts sévères de la CA. La mutation *Schip1*Δ10 entraîne un retard de croissance et des anomalies de guidage des axones de la CA *in vivo*. Les expériences *in vitro* montrent un rôle de SCHIP-1 dans l'initiation, la croissance, et le guidage des axones des neurones du cortex piriforme. Elles montrent également que SCHIP-1 participe à l'adaptation des cônes de croissance à la molécule répulsive de guidage axonal EphB2. Les anomalies développementales décrites pourraient, en outre, conduire à des défauts de comportement chez la souris adulte, notamment dans l'intégration de l'information odorante au niveau du cortex piriforme.

Section: Development/Plasticity/Repair

SCHIP-1 is involved in axon guidance and required for piriform cortex development and anterior commissure formation

Abbreviated title: Role of SCHIP-1 in brain development

Esther Klingler[1,2,3], Pierre-Marie Martin[1,2,3,8], Marta Garcia[1,2,3], Caroline Moreau-Fauvarque[2,4,5], Julien Falk[6], Alain Chédotal[2,4,5], Jean-Antoine Girault[1,2,3], Laurence Goutebroze[1,2,3#]

[1]INSERM, UMR-S 839, F-75005, Paris, France

[2]Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR-S 839, F-75005, Paris, France

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

[4]INSERM, UMR-S 968, F-75012, Paris, France

[5]Institut de la Vision, CHNO des Quinze-Vingts, F-75012, Paris, France

[6]Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR 5534, CGMC, F-69622, Lyon, France

[8]Current address: Department of Psychiatry, University of California, San Francisco, CA94158, USA.

 # Corresponding author: Laurence Goutebroze, Ph.D.

INSERM/UPMC UMR-S 839, Institut du Fer à Moulin

17 rue du Fer à Moulin, F-75005 Paris, France

Tel: + 33 1 45 87 61 44

Fax: + 33 1 45 87 61 32

E-mail: laurence.goutebroze@inserm.fr

Number of pages: 40

Number of figures: 8

Number of tables: 1

Number of words:

Abstract: 244

Introduction: 495

Discussion: 1499

Conflict of Interest: The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgements: This work was supported by Inserm, *Université Pierre et Marie Curie*, and grants from the *Fondation Orange* (14/2009), the *Fondation de France* (2009006047), the *Fondation pour la Recherche Médicale* (FRM, FDT20130928180). EK was recipient of a doctoral fellowship from the *Université Pierre et Marie Curie*. We are grateful to R. Boukhari, A. Rousseau, S. Thomasseau, and M. Savariradjane from the *Institut du Fer à Moulin* for animal care, genotyping and assistance with microscopes. We thank D. Godefroy from the *Institut de la Vision* imaging platform for technical support with nanozoomer acquisitions, A. Bellon from the department of Physiology, Development and Neuroscience of Cambridge University, for advice on piriform cortex cultures, M. Nosten-Bertrand for help with statistical analyses, F. Francis, P. Gaspar, and R. Belvindrah for critically reading the manuscript, all from the *Institut du Fer à Moulin*. Present address of Pierre-Marie Martin: Department of Psychiatry, University of California, San Francisco, California, 94158, USA.

ABSTRACT

SCHIP-1 is a late cytoplasmic component of axonal initial segments and nodes of Ranvier of the peripheral and central nervous system, where it associates with ankyrin$_G$ in multimolecular complexes comprising Na$_v$ channels and cell adhesion molecules (CAMs). SCHIP-1 is also expressed in the CNS during mouse embryonic stages of active axogenesis. Here we report that *Schip1* adult mutant mice (*Schip1*Δ10 mice) display morphological abnormalities of the piriform cortex and of the anterior commissure (AC), which is composed of axons from piriform cortex, anterior olfactory nucleus, and amygdala. We show that AC defects are due to impaired axon elongation and navigation during development. Specifically, piriform cortex neurons from E14.5 mutant embryos display axon initiation/outgrowth delay and guidance defects *in vitro*, and an abnormal sensitivity to EphB2, a repulsive guidance cue crucial for AC development. Time-lapse imaging indicates that SCHIP-1 is required for growth cone recovery after EphB2-induced collapse. Besides, mutant mice display a reduced thickness of the piriform cortex, which affects projection neurons in layers 2 and 3, and is likely to result from cell death rather than from impairment of pyramidal neuron generation or migration. The piriform cortex is thought to play a key role in odor discrimination, association and learning. Interestingly, morphological brain abnormalities in mutant mice are associated with abnormal behavior related to defects in odor processing. Thus *Schip1*Δ10 mutant mice appear to be an interesting model to further characterize piriform cortex as well as AC functions which are yet poorly known.

INTRODUCTION

During the nervous system development axon outgrowth and guidance are key processes for the proper formation of neuronal circuits. SCHwannomin-Interacting Protein 1 (SCHIP-1) is a cytoplasmic protein identified as a partner of schwannomin/merlin (Goutebroze et al., 2000), a protein related to ezrin, radixin, and moesin which are cross-linkers between the membrane and the actin cytoskeleton, and important regulators of axon development (Haas et al., 2004; Cheng et al., 2005; Mintz et al., 2008; Marsick et al., 2012a; Marsick et al., 2012b; Antoine-Bertrand et al., 2011). We previously showed that the IQCJ-SCHIP-1 isoform is a late component of axon initial segments and nodes of Ranvier, two axonal regions highly enriched in Na_v channels important for the initiation and the saltatory conduction of action potentials respectively (Martin et al., 2008). In these regions, Na_v channels sit in a multimolecular complex comprising KCNQ channels and adhesion molecules NrCAM and neurofascin that are anchored to the actin cytoskeleton through their interaction with $ankyrin_G$/βIV spectrin-based cortical cytoskeleton (for review see Buttermore et al., 2013). SCHIP-1 directly interacts with ankyrins (Martin et al., 2008) which bind adhesion molecules involved in axon formation (for review see Bennett and Lorenzo, 2013). $Ankyrin_B$ regulates both axon elongation and navigation (Otsuka et al., 1995; Colavita and Culotti, 1998; Gil et al., 2003; Nishimura et al., 2003) although its precise *in vivo* contribution is poorly characterized (Scotland et al., 1998). The *Schip1* gene is expressed in the brain during stages of active axogenesis (www.genepaint.org and our unpublished data) but its function in axon elongation is unknown.

To investigate the role of SCHIP-1 in brain development, we generated *Schip1*Δ10 mutant mice which lack the 10th conserved exon of the *Schip1* gene, resulting in the absence of the full length protein. In the present study we show that *Schip1*Δ10 mutant mice display a partial agenesis of the bipartite anterior commissure (AC). The piriform cortex, part of the paleo-olfactory cortex characterized by its three-layered organization, is one of the main sources of AC axons (for review see de Castro, 2009). It receives direct inputs from the

olfactory bulbs and plays a key role in odor discrimination, association and learning (for review see Bekkers and Suzuki, 2013). Multiple guidance signals expressed by the axons of the piriform cortex neurons and surrounding regions (thalamus, striatum, and subventricular zone) control the development of the AC including ephrin, netrin and semaphorin families and their receptors (for review see Lindwall et al., 2007).

Using a combination of *in vitro* and *in vivo* approaches, we show that AC defects in mutant mice are due to impaired axon elongation and navigation. Our results suggest that the *Schip1*Δ10 mutation changes axon sensitivity to guidance cues. Indeed we found that the response to EphB2, a guidance cue known to participate in AC formation (Henkemeyer et al., 1996), is impaired in neurons from mutant embryos. In addition our results indicate that impaired axon development may induce cell death in piriform cortex leading to a decreased thickness in mutant mice.

MATERIALS AND METHODS

*Schip1*Δ10 mice and animal experimental procedures

*Schip1*Δ10 mice were generated by deletion of exon 10 of the *Schip1* gene, using homologous recombination in mouse 129/Ola embryonic stem cells (Martin et al., manuscript in preparation). Deletion of exon 10 was predicted to introduce a premature stop codon in the conserved C-terminal domain common to all SCHIP-1 isoforms, and was verified by Southern blot, genomic PCR and RT-PCR. Loss of endogenous SCHIP-1 proteins was shown by immunoprecipitation experiments on brain extracts using different combinations of SCHIP-1 specific antibodies (described in Martin et al., 2008). Mice were backcrossed on a C57BL/6J background for at least 10 generations before experiments. *Schip1*Δ10 mutant mice appeared normal and were fertile, but suffered from a mild growth delay from birth to adulthood. They were group-housed with *ad libitum* access to food and water and a 12 hour - 12 hour light - dark cycle (light phase onset at 7 a.m.). For staging of embryos, the day of vaginal plug was considered E0.5. Research was conducted according to national and international guidelines (EC directive 86/609, French MESR 00984.01). The laboratory was approved to carry out animal experiments by the *Direction Départementale des Services Vétérinaires de Paris, Service de la Protection et de la Santé Animales et de la Protection de l'Environnement* (licence B75-05-22). The principal investigator had a personal authorization (L Goutebroze, licence 75-1533).

Antibodies

Primary antibodies were from the following sources and used with the following dilutions: Tuj-1, mouse, Covance, #MMS-435P, 1:1000; L1CAM, rat, Millipore, #MAB5272, 1:200; NF160, mouse, Sigma, #N5264, 1:250; cleaved caspase 3, rabbit, BD Biosciences, #559565, 1:250; human IgG1, goat, Vector Laboratories, #J0307, 1:250; BrdU, rat, ABcys #117-7513, 1:1000; calretinin, rabbit, Swant, #7699/3H, 1:500; MAP2, chicken, Abcam, #ab5392, 1:1000; Flag, rabbit, Sigma, #F7425, 1:250; digoxigenin (DIG), alkaline phosphatase-coupled, sheep,

Roche, #11093 274910, 1:2500. Cy3, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546 or Alexa Fluor 633 conjugated-secondary antibodies (1:800) or conjugated-phalloidin (1:250) were from Molecular Probes.

Plasmid constructs

To express and detect SCHIP-1 isoforms by immunolabeling in piriform cortex dissociated neurons, mouse cDNAs of SCHIP-1b (GenBank assession number EU163408), SCHIP-1c (GenBank assession number NM_013928.5), and IQCJs-SCHIP-1 (GenBank assession number KJ941154) were fused by PCR 3' to nucleotides encoding the tag Flag, and cloned in a pCIG plasmid (Megason and McMahon, 2002) allowing coexpression of the E-GFP fluorescent protein in the nuclei.

Tissue processing

Adult mice (2 to 3-months old) and E14.5 embryos (for cleaved caspase 3 immunostaining) were deeply anesthetized with pentobarbital (500 mg/kg i.p., Sanofi-Aventis, France) and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.12 M phosphate buffer (PB) pH 7.4 for 10 min. E13.5, E14.5, E16.5, E18.5 embryos and P0 newborn mice were rapidly decapitated. Brains (adult and P0 mice; E16.5 and E18.5 embryos) and heads (E13.5 and E14.5 embryos) were fixed or postfixed in 4% PFA overnight at 4°C and cryoprotected in a 30% sucrose/sodium phosphate buffered saline (PBS) solution for 24 h at 4°C. Five hundred µm-thick horizontal sections of adult brains were produced using a vibratome (Leica, France) for phase contrast analysis. For immunostainings, 30 µm-thick coronal sections of adult brains were produced using a cryotome (microm KS-34, Thermo Scientific, France) and kept at -20°C in cryoprotectant solution (30% ethylene glycol/30% glycerol/0.12 M PB), until use. Brains and heads of P0 mice and embryos were embedded in 7.5% gelatin, 10% sucrose, and 0.12 M PB, snap frozen in isopentane and stored at -20°C until sectioning. Coronal and horizontal 20 µm-thick sections were produced using a cryostat (Microm Microtech, France),

thaw mounted onto Superfrost Plus microscope slides (Thermo Fischer Scientific), air-dried, and stored at -20°C until use.

Primary cultures of dissociated piriform cortex neurons

The piriform cortex from E14.5 embryos was dissected in ice-cold 0.02 M HEPES in Ca^{2+} and Mg^{2+}-free HBSS (Sigma), incubated with 2.5 mg/ml trypsin in $Ca^{2+}$and Mg^{2+}-free HBSS for 15 minutes at 37°C and mechanically dissociated in Neurobasal medium (Invitrogen) after trypsin neutralization with 10% fœtal bovine serum/Neurobasal medium. Dissociated cells were plated on 14 mm coverslips (0.3 X 10^5 cells/coverslip) coated with poly-D-lysine (0.25 mg/ml) and laminin (0.01 mg/ml) and cultured in Neurobasal medium supplemented with 1x B27 (Gibco®) serum free supplement, 1x Glutamax (Invitrogen), and 1% penicillin/streptavidin at 37°C in a CO_2-controled (5%) incubator. Cultures were fixed for immunostaining by adding in the medium ½ volume of preheated 8% PFA/20% sucrose in PBS for 20 minutes. To study the subcellular localization of Flag-tagged SCHIP-1 isoforms, neurons were electroporated with expression constructs after dissociation, using Neon® Transfection System (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol (two 20 ms-pulses, 1350 V) and plated as described above. Neurons were fixed 48h after plating. For collapse assays, EphB2-Fc (R&D system, #467-B2-200) and control Fc fragment (Rockland, #009-0103, 250ng/mL) were added to culture medium two days after plating for 10 or 30 minutes before fixation. For time-lapse imaging, neurons were grown in µ-Slide 8 well-ibiTreat Microscopy Chamber (Ibidi, #80826) at 0.3 X 10^5/well coated with poly-D-lysine (0.25 mg/ml) and laminin (0.01 mg/ml).

Primary cultures of piriform cortex explants

For explant axon growth and co-culture experiments, pieces of tissue comprising the anterior piriform cortex and the anterior olfactory nucleus, and more posteriorly located piriform cortex, respectively, were dissected from E14.5 embryos and manually cut into ~ 500 µm-

diameter explants. For co-culture experiments, the region lining the piriform cortex, corresponding to the lateral striatum, was also dissected and cut into ~500 µm-diameter explants. Explant cultures were performed in three-dimensional plasma clots as described previously (Castellani et al., 2000) and fixed in 4% PFA/10% sucrose/PBS, after 24 h in culture.

Immunostaining

Fixed neurons/explants on coverslips or tissue sections were incubated in permeabilization/saturation (PS) solution (0.25% Triton X-100, 5% bovine serum albumin, PBS) for 2 h at room temperature (RT) and then incubated with primary antibodies diluted in the same solution overnight at 4°C. After 3 PBS washes, incubation with Alexa Fluor conjugated-secondary antibodies diluted in PS solution was performed for 2 h at RT. Then, coverslips and tissue sections were washed again 3 times in PBS and mounted with DAPI-containing Vectashield (Vector Lab). For membrane-bound EphB2-Fc immunolabeling, fixed neurons were not permeabilized and all incubations were performed in 5% bovine serum albumin/PBS. EphB2-Fc was detected using a human anti-IgG1 antibody. To visualize F-actin, neurons were incubated for 30 min with Alexa Fluor conjugated-phalloidin diluted in PBS after secondary antibody incubation.

Nissl coloration

E14.5, E16.5, P0 and adult cryostat coronal sections were treated in sequential baths: 1X 70% ethanol (EtOH), 1X 95% EtOH, 2X 100% EtOH, 2X 100% EtOH, 1X 95% EtOH, 1X 70% EtOH, 10 seconds/bath. Sections were then stained with cresyl violet (5 mg/ml in 0.6% acetic acid) for 2 minutes, and post-treated in 1X 70% EtOH, 1X 95% EtOH, 2X 100% EtOH, 2X xylene, 10 seconds/bath. Sections were finally mounted with Eukitt® quick-hardening mounting medium (Sigma, #03989).

BrdU assay

Timed-pregnant heterozygous females received an intraperitoneal injection of 50 mg/kg BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine, Sigma) at E12.5. Embryos were then collected at E14.5 or E18.5 and tissue prepared as described above. For BrdU immunostaining, sections were permeabilized and blocked in 0.2% Triton X-100/4% BSA/PBS for 2 h at RT. DNA was denaturated with pre-heated 2 N HCl for 40 min at 37°C and sections were then washed in PBS. The following procedure was identical to that described above for immunostaining.

Image acquisitions and analysis

Immunolabeled and Nissl stained brain sections were scanned with a Hamamatsu Nanozoomer Digital Pathology (NDP) 2.0 HT (High Throughput) device (Hamamatsu Photonics, Japan and NDPView Nanozoomer associated software), with fluorescence unit option (L11600-05), and the NanoZoomer's 3-CCD TDI (Time Delay Integration) camera (Hamamatsu Photonics), resolution of 0.23 µm/pixel (40X). BrdU stained brain sections, immunolabeled non-transfected neurons and explants were imaged using a DM6000-2 Leica microscope. Images of immunolabeled neurons expressing Flag-tagged SCHIP-1 isoforms were acquired with a SP5 confocal microscope (Leica).

All image analyses were performed using ImageJ software. The thicknesses of the piriform cortex and its three layers, and of the neocortex at the level of the somatosensory cortex, were measured on coronal sections through antero-posterior axis. Three sections were quantified and averaged per animal. For layer thickness measurement, three equidistant lines perpendicular to the surface of the layers were drawn on each image, as described previously (Sarma et al., 2011). The thickness of each layer was measured along these 3 lines and averaged per section. For morphological studies of dissociated neurons, 100 neurons per embryo were analyzed with 3 (DIV1) or 10 (DIV2) embryos per genotype (40X acquisitions). The length of axons immunolabeled with Tuj-1 was measured using the NeuronJ plugin. For explant axon growth experiments, 6 explants per embryo were analyzed

with 10 embryos per genotype (20X acquisitions). The axon growth area was calculated by subtracting the explant area from the total area occupied by the explant and the axons. To estimate axon guidance, we used a qualitative guidance index previously described by Castellani et al. (2000) and Falk et al. (2005). The global influence of the lateral striatum on the piriform cortex axon trajectories was scored blindly from -2 (when most axons grew away from the lateral striatum) to 2 (when most axons grew toward the lateral striatum). Six explants per embryo were analyzed with 10 embryos per genotype (20X acquisitions). To quantify the collapse feature, 50 growth cones per embryo were blindly analyzed with 6 embryos per genotype (63X acquisitions). Control growth cones exhibited complex profiles with multiple filopodia and broad lamellipodia, whereas collapsed growth cones typically lacked lamellipodia and possess only one or two filopodia. To quantify EphB2-Fc bound to growth cones, 100 growth cones per embryo were analyzed (100X acquisitions).

Time-lapse imaging

Two days after plating, neurons were placed on a motorized stage and maintained at 37°C using a thermostated chamber. Transilluminated time-lapse microscopy was performed using an inverted microscope DMI4000 Leica with a 63x/1.4 N.A. objective (1 acquisition/20 sec during 15 min, z=5 µm, z-step=1 µm). To quantify the proportion of collapsed growth cones at t=10 min or 15 min, the value 1 was assigned to collapsed growth cones and the value 0 to non-collapsed growth cones. The same method was used to quantify the recovery of collapsed growth cones. The proportion was defined as the number of value 1 compared to the total number of analyzed growth cones. Twelve growth cones/embryo (6 embryos/genotype) were analyzed.

Visualization of AC axons by fluorescent lipophilic tracer

1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate ('DiI'; DiIC18(3), Invitrogen, #D-3911) crystals were used to visualize the pathway of AC axons. Brains from

E16.5 embryos were fixed for one week by immersion in 4% PFA/0.12 M PB. DiI crystals were directly injected in the base of the olfactory bulb to target the anterior olfactory nucleus/anterior piriform cortex or in the posterior piriform cortex with an Austerlizt INSECT PINS® (Minutiens diam. 0.20 mm, FST #26002-20). After injection, brains were incubated in PBS for 15 days at 37°C in a dark environment, embedded in 3% agarose/PBS, sliced into 100 µm-thick coronal sections with a vibratome (Leica, France), and imaged with a macroscope MVX10 (Olympus).

In situ hybridization

E13.5, E14.5 embryonic and P0 mouse brains were fixed by immersion with 4% PFA in PBS. Brains were postfixed for 2 h, cryoprotected in 10 % sucrose/PBS, frozen in isopentane and stored at -80°C. Serial sections (20 µm) were cut with a cryostat (Microm Microtech, France) and stored at -80°C before hybridization. Sense and antisense riboprobes were generated and labeled with digoxigenin-d-UTP by *in vitro* transcription (Roche Diagnostics) from a mouse *Schip1* cDNA encoding the C-terminal residues conserved in all SCHIP-1 isoforms (nt[975-1758], GenBank accession number EU163407) cloned in pBluescript II KS+. *In situ* hybridization was performed on tissue sections as described previously (Moreau-Fauvarque et al., 2003). Brains sections were scanned with the Hamamatsu Nanozoomer Digital Pathology (NDP) device as described above.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with StatView software, Abacus. For variables that did not follow a normal distribution, statistical analyses were carried out using the Mann–Whitney rank sum test to compare quantitative variables between WT and *Schip1*Δ10 mice. Proportions were compared using the Chi² test. For brain analyses along the antero-posterior axis, odor discrimination and habituation assay, data were subjected to factorial two-way ANOVA with genotype, brain region, and time spent sniffing as between-group factors.

Significant main effects were further analyzed by post hoc comparisons of means using Newman–Keuls test. The significance was established at a P-value < 0.05.

RESULTS

*Schip1*Δ10 adult mice display axon tract abnormalities, which are particularly severe in the AC

The weight and global shape of *Schip1*Δ10 mutant adult brains were not different from those of wild-type (WT) littermates (data not shown). However, histological analyses revealed white matter tract defects, in the AC and to a lesser extent in the corpus callosum (Fig. 1). The AC is formed by two branches. The anterior branch (ACa) is composed of axons of the anterior olfactory nucleus and the anterior piriform cortex, and the posterior branch (ACp) of axons of the posterior piriform cortex and the amygdala (Pires-Neto and Lent, 1993; Cummings et al., 1997) (Fig. 1*A*). Horizontal sections showed a severe decrease in the thickness of the ACa and the absence of ACp in all mutants (Fig. 1*B*). Serial coronal sections labeled with neurofilament (NF160) antibodies to detect axonal projections confirmed these observations, showing that mutant mice displayed a reduced ACa bundle area compared to WT mice. This decrease was more severe in the ACa caudal region (Fig. 1*C*, i-ii and Fig. 1*D*). The phenotype was even more striking for the ACp that was missing in all mutants (Fig. 1*C*, iii). Mutant mice also displayed a thinner corpus callosum at the midline in caudal regions compared to WT mice (Fig. 1*C*, iii and Fig. 1*E*). These observations suggested a decreased number of axons composing the caudal regions of the corpus callosum and the ACa, and an absence of ACp axons in *Schip1*Δ10 mutant mice.

*Schip1*Δ10 adult mice display a decrease in piriform cortex thickness and abnormal odor processing

As AC axons arise mainly from the piriform cortex, we asked whether this structure was affected in *Schip1*Δ10 mutant mice. We analyzed its three-layered organization in coronal sections of adult brains immunolabeled with MAP2 and calretinin antibodies to label dendrites in the three layers and the lateral olfactory tract (LOT, Fig. 1*A*) respectively (Sarma et al., 2011). We defined as anterior the piriform cortex at the level of the ACa along the

rostro-caudal axis (Fig. 1*C*, ii) and as posterior the piriform cortex at the level of the ACp (Fig. 1*C*, iii). The three-layered organization was conserved in mutant mice (Fig. 2*A*). Remarkably, the piriform corex overall thickness was decreased in the posterior region, whereas no significant defect could be observed in the thicknesses of either the anterior piriform cortex, or the primary somatosensory neocortex (Fig. 2*A*, *B*). In the posterior piriform cortex, both layers 2 and 3 were thinner in mutant than in WT mice (Table 1). The layer 2 of the anterior piriform cortex was also thinner in mutants, whereas neither the LOT, nor layers 1a, 1b and 3 were affected (Table 1). The layer 1 is mainly composed of LOT axons originating from olfactory bulb (Fig. 1*A*). Thus the *Schip1*Δ10 mutation appeared to specifically affect projection neuron layers of the piriform cortex. The decreased thickness is restricted to layer 2 in the anterior region and not detectable by measurement of the overall thickness. It is more dramatic in the posterior region where both layers 2 and 3 are affected.

Since the piriform cortex plays a key role in odor discrimination, association and learning (for review see Bekkers and Suzuki, 2013), we checked whether *Schip1*Δ10 mutant mice displayed abnormal odor processing. Mutant mice spent the same amount of time to find hidden food in their bedding as WT mice in a buried food test (Yang and Crawley, 2009), indicating no primary sensory defects in odor perception (data not shown). To further determine whether mutant mice exhibited odor discrimination defects, we evaluated the ability of females to recognize a food odor (banana) and a social odor (urine from males), and to habituate to these odors by presenting them 3 consecutive times (Fig. 2*C*). *Schip1*Δ10 mutant mice did recognize and habituate to the different odors but displayed a significantly decreased interest in the social odor as compared to WT females, which was not the case for the food-attracting odor (Fig. 2*C*). These observations suggested that the piriform cortex alterations in mutant mice may impair specific aspects of odor association.

The decrease in posterior piriform cortex thickness appears from E16.5 on in *Schip1*Δ10 mice and affects projection neuron layers

To determine the timing of abnormalities in *Schip1*Δ10 mutant piriform cortex, we measured its overall thickness from E14.5 to adulthood in cresyl violet-stained coronal brain sections. As expected, the thickness of the mutant anterior piriform cortex was not affected over development (Fig. 3*A*, ANT). In contrast the decreased thickness of the posterior piriform cortex was visible from E16.5 (Fig. 3*A*, POST). Since in mouse embryos AC axons start to grow at E13.5 (Schneider et al., 2011) and by E16.5 the AC is fully established, these results showed that the defect in posterior piriform cortex overall thickness appeared coincidental with the completion of AC development.

To determine whether more specific defects could be detected in developing piriform cortex, we analyzed the thickness of each layer. Both in WT and mutant embryos, the layers were not detectable at E14.5. From E16.5 on, the piriform cortex started to organize in three layers with increased cell density in layer 2, even though the precise layer delimitations remained poorly defined (data not shown). At E18.5, the layer 2 could clearly be distinguished and appeared significantly thinner in the posterior piriform cortex of mutant embryos, and also slightly affected in the anterior region (ANT, WT: 79.8 ± 4.5 µm, Δ10: 68.7 ± 2.6 µm, t-test, p=0.098; POST, WT: 73.0 ± 2.4 µm, Δ10: 63.7 ± 2.2 µm, t-test, p=0.046; means ± SEM, N=3 embryos/genotype). At P0 the three layers were clearly detectable (Fig. 3*B*). The layer 2 was significantly thinner in mutant anterior piriform cortex (WT: 99.8 ± 1.4 µm, Δ10: 87.0 ± 2.3 µm, t-test, p=0.0027; means ± SEM, N=5 animals/genotype) while layers 1 and 3 were not affected (layer 1, WT: 108.6 ± 9.2 µm, Δ10: 98.3 ± 2.8 µm, t-test, p=0.27; layer 3, WT: 249.7 ± 16.3 µm, Δ10: 232.8 ± 6.0 µm, t-test, p=0.32; means ± SEM, N=5 animals/genotype). The posterior piriform cortex was more affected, both layers 2 and 3 displaying severe reduced thicknesses (Fig. 3*C*). The formation of the projection neuron layers of both anterior and posterior piriform cortex is thus affected during development. In line with the morphological observations in adult mice, the decreased

thickness is restricted to layer 2 in the anterior piriform cortex and less dramatic than in the posterior piriform cortex.

_Schip1_Δ10 mutation impairs cell survival but not generation of pyramidal neurons in piriform cortex

The decreased thickness of the projection neuron layers in *Schip1*Δ10 mutant mice could result either from a decrease in the number of cells composing these layers or from an abnormal organization leading to an increased density of cell bodies. To address this question, the cell density in layer 2 was first determined by confocal imaging of serial coronal sections from newborn mice stained with DAPI. We found no difference in cell density in layer 2 between mutant and WT newborn mice either in anterior (WT: 10.56 ± 0.20 $x10^3$ nuclei/mm², Δ10: 9.98 ± 0.17 $x10^3$ nuclei/mm²; means ± SEM, t-test, p=0.14; N=5 animals/genotype) or in posterior piriform cortex (WT: 9.82 ± 0.22 $x10^3$ nuclei/mm², Δ10: 10.07 ± 0.34 $x10^3$ nuclei/mm²; means ± SEM, t-test, p=0.56; N=5 animals/genotype). These results showed that the reduced thickness of layer 2 in mutant mice reflect a reduction in the number of cells that were normally part of this layer.

Pyramidal cells of layer 2 are mostly generated at E12.5 (Sarma et al., 2011) in the corticostriatal border of the ventricular zone and migrate tangentially mainly through the lateral cortical stream to reach the piriform cortex (Carney et al., 2006). To determine whether *Schip1*Δ10 mutation alters the generation or the migration of these neurons, pregnant females at E12.5 were injected with BrdU. The density of BrdU immunopositive cells that reached the piriform cortex was the same in mutant and WT piriform cortex at E14.5 (Fig. 3*D*, *E*), indicating the lack of obvious defect in early migration of mutant neurons and further suggesting that neurons whose axons initially form the AC were present in the mutant piriform cortex at this stage. At E18.5, when the layers start to be recognizable, no difference in BrdU immunopositive cell density was observed between mutant and WT layers 2 (Fig. 3*F, G*). Since we showed that the layer 2 is thinner in E18.5 mutant embryos, this

observation suggested that projecting cells were produced correctly but subsequently disappeared in the mutant piriform cortex layer 2.

We then asked whether the thickness defects observed in the mutant piriform cortex could be due to abnormal cell death and studied apoptosis at the developmental stage of intense axogenesis E14.5. Immunolabeling performed on serial sections with an antibody against cleaved caspase 3 showed an increased cell death in mutant piriform cortex, which was not observed in the neocortex (Fig. 3*H*). Furthermore, the increase in cleaved caspase 3 immunopositive cells was more pronounced in the posterior (Fig. 3*H,* POST) than in the anterior piriform cortex (Fig. 3*H,* ANT) (1.6 fold more caspase 3+ cells in posterior than in anterior, ****p*=0.0004, N=3 embryos/genotype). The higher cell death in the posterior compared to the anterior piriform cortex in E14.5 mutant embryos was consistent with the more severely decreased thickness observed in the posterior piriform cortex at later embryonic stages.

Early development of AC axons is altered in *Schip1*Δ10 embryos

The AC starts to develop between E13.5 and E14.5, with pioneer axons detected at the midline at E14.5 (Schneider et al., 2011) (Fig. 4*A*, *B*, WT). To examine outgrowth of AC axons in *Schip1*Δ10 mutant embryos, serial coronal sections were immunolabeled with L1CAM antibodies (Fig. 4*A*, *B*). At E13.5, the first pioneer axons of the ACa were visible in WT embryos whereas these fibers were not detectable in mutant embryos whatever the section plane (Fig. 4*A*). Moreover, at E14.5 no AC axon was detected at the midline in mutant sections (Fig. 4*B*). Thus AC formation was impaired in mutant embryos, suggesting that SCHIP-1 is crucial for the initial steps of AC development.

To further characterize the defects in ACa and ACp, we immunolabeled serial horizontal brain sections from E16.5 embryos with L1CAM antibodies. In WT embryos both AC branches were fully developed as previously shown by Schneider et al. (2011). By

contrast E16.5 mutant embryos displayed thinner ACa tracts (Fig. 4*C*, arrows) whose axons never reached the midline. Selecting specific mutant horizontal sections in which ACa axons were the closest to the midline, we determined that ACa axons stopped 432 ± 142 µm from the midline (mean ± SEM, N=4 Δ10 embryos). The ACp tract was largely absent in all mutant embryos. Very few axons arose from the posterior piriform cortex and seemed stunted, often misprojecting to rostral regions (Fig. 4*C*, arrowheads).

To determine whether ACa axons of E16.5 mutant embryos were misprojecting towards other brain regions, we performed dye-tracing experiments with DiI (as sketched in Fig. 4*Da*). In serial horizontal slices, ACa axons that crossed the midline and projected towards the contralateral anterior olfactory nucleus were observed in WT injected-brains, whereas mutant ACa labeled axons appeared less numerous and stopped before crossing the midline without projecting to another brain region (Fig. 4*Db*, arrows). Labeled axons from the posterior piriform cortex were very rare in mutant embyros and stopped growing close to the rostral ipsilateral cortex instead of projecting to the midline (Fig. 4*Dc*, arrowheads). Altogether, these observations, summarized in Fig. 4*E*, suggested a guidance defect in addition to an outgrowth delay for ACp axons, in mutant embryos.

Schip1 is expressed in the piriform cortex and surrounding cerebral structures during early development

AC establishment relies on the complex interaction of several guidance cues (for review see Lindwall et al., 2007). SCHIP-1 could therefore contribute to AC formation by playing a role in axon outgrowth and guidance of piriform cortex neurons (cell-autonomous function). Alternatively, SCHIP-1 could regulate the expression of guidance cues by tissues/cells, surrounding the developing AC (non cell-autonomous function). To address this issue, we first studied *Schip1* expression pattern during brain development by *in situ* hybridization of WT E13.5, E14.5 and P0 coronal brain sections (Fig. 5). *Schip1* showed expression in the

anterior olfactory nucleus, the amygdala and the piriform cortex, which are the brain regions where AC projecting neurons are localized. *Schip1* was also expressed in the hippocampus, the ventricular/subventricular zones, the cortical plate, the thalamus (lateral and medial septal nuclei), and the striatum. The thalamus, the striatum, and the subventricular zone are known to express guidance molecules necessary for AC axon guidance (Henkemeyer et al., 1996; Ho et al., 2009; Falk et al., 2005; Sahay et al., 2003). These results indicated that SCHIP-1 could have both cell-autonomous and non cell-autonomous functions in AC axon development.

SCHIP-1 plays a role in axon initiation and outgrowth

To study SCHIP-1 function in axon outgrowth, we developed cultures of piriform cortex from E14.5 embryos, a stage of active axon outgrowth in WT embryos and at which the thickness of the cortex is not affected in mutant embryos (Fig. 3). We first estimated axon outgrowth by quantifying the surface covered by the axons of anterior and posterior piriform cortex explants immunolabeled for Tuj-1 after 2 days in culture (Fig. 6*A*, *B*). Axon outgrowth areas of mutant explants were significantly lower than those of WT explants (Fig. 6*C*). Defects were similar in anterior and posterior piriform cortex explants.

To decipher in more details which step of axon development was impaired by the *Schip1*Δ10 mutation, we cultured dissociated piriform cortex neurons. Characterization of these cultures indicated that neurons (Tuj-1 immunopositive cells), which represented more than 80% of the total number of cells, developed similarly to dissociated hippocampal neurons. They started to develop by forming lamellipodia and later minor processes, and then formed one longer process and some shorter neurites within 48 h (day *in vitro* 2, DIV2). In addition, 80% of neurons expressed the cell adhesion molecule NrCAM known to be important during piriform cortex development (Lustig et al., 2001). RT-PCR showed that WT dissociated neurons expressed the same *Schip1* isoforms as those expressed in E14.5 piriform cortex *in vivo* (SCHIP-1b, SCHIP-1c and IQCJs-SCHIP-1) (data not shown). Since a

proportion of neurons are likely to die *in vivo* between E14.5 and E16.5 in mutant embryos (Fig. 3*H*), we also checked cell survival in dissociated cultures. No difference in the density of neurons was observed between WT and mutant cultures (DIV2, WT: 34.1 ± 1.6 neurons/field, Δ10: 33.3 ± 1.1 neurons/field, p=0.69, N=5 embryos/genotype; DIV4, WT: 40.8 ± 1.5 neurons/field, Δ10: 43.9 ± 2.2 neurons/field, p=0.25, N=3 embryos/genotype; means ± SEM, Mann-Whitney). Moreover, immunolabelings for cleaved caspase 3 showed no difference between WT and mutant cultures at DIV1 (WT: 2.8 ± 0.27% positive cells, Δ10: 2.3 ± 0.39% positive cells; means ± SEM, Mann-Whitney, p=0.33, N=3 embryos/genotype). Altogether these results demonstrated that, unlike *in vivo*, there was no obvious cell death increase in cultures of dissociated piriform cortex neurons from mutant embryos. Thus, we analyzed the morphology of dissociated neurons in these cultures. The immature neuritogenesis stage was over-represented in mutant embryo cultures at DIV1 and DIV2 (Fig. 6*D*), indicating a role for SCHIP-1 in axon initiation. Measurements on neurons that exhibited one longer process and shorter neurites (Fig. 6*E*) showed that the axon length of mutant neurons was decreased at DIV1, DIV2 (Fig. 6*E*, *F*) and DIV4 (data not shown). These results showed that SCHIP-1 plays a role in axon initiation and elongation in dissociated neurons from the piriform cortex.

Since endogenous expression of SCHIP-1 was not detectable with our antibodies, we examined the subcellular localization of SCHIP-1 in growing axons by electroporating Flag-tagged SCHIP-1 isoforms in WT neurons. Both at DIV1 (data not shown) and DIV2, SCHIP-1b displayed a punctate localization all along the neurites and in the growth cones (Fig. 6*G*, *H*), where it was found in the central region but also in the peripheral actin-rich domains that drive axon elongation (lamellipodia and filopodia) (Fig. 6*I*). The same localization was observed for SCHIP-1c and IQCJs-SCHIP-1 isoforms also expressed endogenously in the E14.5 piriform cortex. Thus, SCHIP-1 distribution within neurons is consistent with its role in axon outgrowth.

SCHIP-1 plays a different role in guidance of ACa and ACp axons

Since the axons of both anterior and posterior *Schip1*Δ10 mutant piriform cortex displayed outgrowth delay *in vitro*, we asked how they would each respond to guidance cues from the surrounding tissues, in particular to repellent cues expressed in the lateral striatum. The lateral striatum is the first brain structure encountered by piriform cortex axons when they grow toward the midline. In addition, the striatum is known to express several guidance cues including semaphorin 3F (Falk et al., 2005; Sahay et al., 2003) and EphB2 (Cowan et al., 2004) that control AC formation. We therefore initiated co-culture assays of explants from E14.5 anterior and posterior piriform cortex, with explants of the lateral striatum (Fig. 7*A*). Cortical explants but not striatal explants developed long and detectable axons (Fig. 7*B*). We determined the guidance index for cortical explants, as described by Castellani et al. (2000) and Falk et al. (2005), which takes into account the density and the length of axons growing toward and away from the striatal explant (Fig. 7*B*). In WT cultures, axons of anterior cortical explants were strongly repelled by the lateral striatum whereas the axons of posterior cortical explants were not affected, revealing specific and differential intrinsic guidance properties of the neurons of the anterior and the posterior piriform cortex (Fig. 7*C*). This difference was abolished in co-cultures of mutant explants. Both the anterior and posterior piriform cortex axons from mutant explants displayed a significant repulsive response (Fig. 7*C*). These observations indicated that SCHIP-1 may play a specific role in guidance mechanisms of ACp axons allowing them to project through the lateral striatum, and are consistent with ACp abnormalities observed in mutant embryos (Fig. 4*D*, *E*).

SCHIP-1 participates in growth cone recovery after EphB2-induced collapse

The guidance molecule EphB2 plays a key role in the development of the AC, notably of the ACp (Henkemeyer et al., 1996). The interaction of EphB2 with ephrin-B2 expressed by AC axons, is necessary for the proper guidance of ACp axons overriding repulsion mechanisms (Cowan et al., 2004). The extracellular domain of EphB2 is sufficient to induce collapse of

growth cones expressing ephrin-B (Mann et al., 2003). Thus, we investigated the implication of SCHIP-1 in the response of piriform cortex neurons to EphB2 by growth cone collapse assays. Immunolabeling with an antibody against human Fc confirmed that the Fc-coupled extracellular domain of EphB2 (EphB2-Fc) bound to piriform cortex neurons in culture (Fig. 8*A*). In control conditions, the proportion of collapsed growth cones was low and similar in WT and mutant cultures showing that the *Schip1*Δ10 mutation does not affect the basal collapse rate of growth cones. EphB2-Fc induced the collapse of growth cones after 10 minutes in WT and mutant cultures. However after 30 minutes, while the number of collapsed growth cones was reduced in WT, it remained high in mutant cultures (Fig. 8*B*). In addition, the number of membrane EphB2-Fc puncta was also higher in mutant than WT collapsed growth cones after 30 minutes of EphB2-Fc incubation, whereas it was similar after 10 minutes of incubation (Fig. 8*C*).

To further analyze the response of growth cones to EphB2-Fc, we performed time-lapse imaging using videomicroscopy (Fig. 8*D*). The onset of growth cone collapse was comparable in WT and mutant neurons (Fig. 8*E*). The distance of filopodia retraction at 15 minutes of EphB2-Fc incubation was also equivalent (Fig. 8*F*), indicating that the EphB2-induced collapse feature *per se* was not affected by *Schip1*Δ10 mutation. At 10 minutes of EphB2-Fc incubation, the proportion of collapsed growth cones was similar in WT and mutant cultures. This proportion decreased in WT at 15 minutes of EphB2-Fc incubation whereas it remained unchanged in mutant cultures (Fig. 8*G*). Moreover, growth cones that displayed recovery after collapse during the 15 minutes of EphB2-Fc incubation were significantly less numerous in mutant than in WT cultures (Fig.8*H*). Altogether, these results showed that mutant piriform cortex axons exhibit a changed responsiveness to EphB2 and indicate that SCHIP-1 controls the sensitivity of axons to this guidance cue.

DISCUSSION

In the present study, we demonstrate that SCHIP-1 plays an important role during brain development. *Schip1*Δ10 mutant mice exhibit a thinner piriform cortex and severe defects of the AC. They present abnormal odor association behavior that may be related to these morphological defects. We show that SCHIP-1 regulates both axon elongation and pathfinding *in vivo*. *In vitro* assays demonstrate a role of SCHIP-1 during axon initiation, outgrowth, and guidance. They also indicate that SCHIP-1 contributes cell-autonomously to the sensitivity to at least one guidance cue, EphB2, known to control AC formation.

The role of SCHIP-1 in axon outgrowth and guidance is supported by the convergence of *in vivo* and *in vitro* observations. In adult mutant mice, ACa and ACp display differential morphological abnormalities. ACa is present but thinner than in WT mice, whereas ACp is absent. Developmental studies indicate that both ACa and ACp abnomalities result from altered axon growth, with in addition guidance defects for ACp axons. ACa axons appear to follow the proper “route” to the midline, suggesting no major guidance defect. *In vitro* studies on cultures of piriform cortex neurons are consistent with these observations. Neurons from mutant piriform cortex display cell-autonomous impaired axon elongation. Mutant posterior piriform cortex explants display, in addition, a repulsive response when co-cultured with lateral striatum explants, which is not observed for WT explants. In similar assays, the guidance response of anterior piriform cortex explants is not affected by the *Schip1*Δ10 mutation. This demonstrates a specific and abnormal behavior of mutant posterior piriform cortex axons in response to environmental cues. We observed that growth cone recovery after EphB2-induced collapse is affected in mutant neurons. Both ACa and ACp axons express ephrin-B guidance molecules. EphB2 acts as a ligand for ephrin-B2. However, EphB2-induced repulsion is crucial only for ACp but not ACa development (Cowan et al., 2004; Ho et al., 2009). Lack of growth cone recovery may therefore affect more specifically ACp axon guidance *in vivo*. It may also further impinge on axon elongation of ACp. Consistently, axon outgrowth defects in cultures from mutant embryos are less

dramatic than those of ACp *in vivo.* Other repulsive guidance cues and receptors have been shown to contribute to ACp development such as the semaphorin 3F and its receptor neuropilin-2 (Giger et al., 2000; Sahay et al., 2003). Thus the severe agenesis of ACp in *Schip1*Δ10 mutant mice may result from a combination of impaired response of axons to EphB2 and other guidance cues.

The mechanisms by which SCHIP-1 could participate to axon development are unclear. Axon outgrowth and guidance rely on a cascade of cellular events including signal integration by cell adhesion molecules (CAMs) and guidance receptors at the membrane, and dynamic cytoskeleton reorganizations so that growth cones turn, extend, or retract appropriately. CAMs of the L1-subgroup (neurofascin, NrCAM and L1CAM) have been implicated in multiple aspects of these processes (for review see Kiryushko et al., 2004). Cytoskeletal proteins such as ankyrins regulate axon initiation/elongation and guidance (Kunimoto and Suzuki, 1995; Otsuka et al., 1995). Ankyrins associate directly with intracellular motifs of L1-CAMs (for review see Herron et al., 2009). Ankyrin$_B$ binding plays a crucial role in the regulation of L1CAM-mediated adhesion and migration, inhibition of L1CAM/ankyrin interactions promoting L1CAM-mediated axon growth (Gil et al., 2003; Nishimura et al., 2003). We previously showed that SCHIP-1 interacts directly with ankyrins and is part of complexes at nodes of Ranvier and axon initial segment containing two L1-CAMs, NrCAM and neurofascin. L1CAM and NrCAM are expressed by anterior and posterior piriform cortex neurons. Thus one way in which SCHIP-1 could mediate axon outgrowth could be by regulating ankyrin interactions and responsivness of L1-CAMs.

Ephrin-B signaling transduction upon EphB/ephrin-B interaction involves molecular pathways governed by the ability of ephrin-B to recrute upon phosphorylation of its cytosolic tail, adaptor proteins and signaling molecules leading to the retraction of growth cones (for review see Xu and Henkemeyer, 2012). This process needs termination mechanisms to lower receptor levels at the membrane and to allow growth cone desensitization and adaptation to guidance cues within the local environment (Piper et al., 2005). Two pathways

have been so far highlighted for EphB/ephrin-B molecules, one through presenilin-dependent intramembrane cleavage of ephrin-B and the other through a clathrin-mediated endocytosis mechanism of EphB/ephrin-B complexes (Georgakopoulos et al., 2006; Tomita et al., 2006; Marston et al., 2003; Zimmer et al., 2003; Parker et al., 2004). Since the *Schip1*Δ10 mutation does not affect the early dynamics of EphB2-induced growth cone collapse *in vitro*, SCHIP-1 is unlikely to play a major role in ephrin-B reverse signaling. By contrast, the lack of growth cone recovery is coupled with persistence of high numbers of EphB2-Fc clusters on the surface of growth cones after long-lasting EphB2-Fc incubation in mutant cultures. This suggests that SCHIP-1 could contribute to the regulation of ephrin-B internalization. However the precise role of SCHIP-1 is difficult to predict since the molecular mechanisms of ephrin-B internalization are unknown. It has been shown that L1CAM/CHL1 interact with ephrin-A and are required in repulsive responses (Demyanenko et al., 2011). Further investigations will be necessary to determine whether SCHIP-1 could be associated with plausible ephrin-B/L1-CAMs complexes due to its ability to interact with ankyrins, or alternatively be part of complexes more specifically associated with ephrin-B intracellular domain alone.

SCHIP-1 is able to interact with schwannomin/merlin which mediates neurite outgrowth (Yamauchi et al., 2008; Schulz et al., 2010). Merlin is related to the ERM proteins which coordinate membrane and actin dynamics allowing growth cone navigation and response to guidance cues (Paglini et al., 1998; Haas et al., 2004; Cheng et al., 2005; Mintz et al., 2008; Antoine-Bertrand et al., 2011; Marsick et al., 2012a; Marsick et al., 2012b). Underlying mechanisms are likely to involve the direct association of ERMs with the intracellular domains of L1CAMs (Schlatter et al., 2008; Herron et al., 2009). Whether schwannomin/merlin presents similar functions as the ERMs, and how it could contribute to SCHIP-1-mediated axon outgrowth and guidance as a membrane-cytoskeleton crosslinker protein, would be an interesting point to further investigate.

Our results also show that ACa defects are associated with cell death in the anterior piriform cortex at E14.5 and a mild decreased thickness of the layer 2 from E.18.5, whereas

severe impaired ACp development is associated with higher cell death in the posterior piriform cortex and stronger decreased thickness of both layer 2 and 3. Furthermore impaired axon development predates the change in piriform cortex thickness. This suggests that defects in axon elongation and pathfinding may lead to increased cell death and later reduced layer thickness. Since dissociated neurons from mutant embryos do not exhibit increased cell death *in vitro*, cell death *in vivo* may depends on extrinsic factors. Neurons from the mutant piriform cortex may be more exposed or more sensitive to pro-apoptotic signals than WT neurons. Repulsive guidance cues of the semaphorin or ephrin families have also been shown to induce neuronal cell death (for reviews see Park et al., 2013; Vanderhaeghen and Cheng, 2010). Alternatively or in addition, because axons do not develop properly, mutant neurons may not have access to anti-apoptotic factors such as neurotrophic factors. Axonal uptake of neurotrophic factors secreted by distant target cells has been shown to be important for neuronal survival in the PNS (for review see Huang and Reichardt, 2001). Although this retrograde signaling is not formally established in the CNS, axon formation was shown to be required for neurons of the cerebral cortex to survive (Barnes et al., 2007).

To date studies of piriform cortex functions have been almost exclusively based on electrophysiological recordings and calcium imaging in WT mice or mice lacking olfactory receptors or olfactory sensory neurons (for review see Bekkers and Suzuki, 2013). Very few mutant mice displaying piriform cortex morphological anomalies have been described. To our knowledge *Schip1*Δ10 mutant mice represent the first mouse model with a conserved three-layered organization but decreased number of cells in layers 2 and 3. Layer 2 contains two morphologically and functionally distinct classes of glutamatergic principal neurons, semilunar and superficial pyramidal cells, engaged differentially in afferent and intracortical associational circuits respectively. These cells are thought to provide two layers of synaptic processing allowing the piriform cortex to sequentially process olfactory information within segregated subcircuits (Suzuki and Bekkers, 2011, 2006). The cellular characterization of

*Schip1*Δ10 mutant piriform cortex should help to determine whether cells missing in mutant mice correspond to a unique class of principal neurons, and also to the identification of the neurons that normally project their axon through the AC. The anterior and the posterior piriform cortex are thought to have specific functions in odor processing, i. e. in the structural odor identity and in the perceptual category of the odor, respectively (for review see Gottfried, 2010). *Schip1*Δ10 mutant mice therefore appear to be a promising model to further characterize piriform cortex and anterior commissure development and their later functions in odor processing and integration, as well as specific molecular and cellular aspects of axon elongation and navigation including cytoskeleton-associated proteins contribution and growth cone recovery mechanisms.

REFERENCES

Antoine-Bertrand J, Ghogha A, Luangrath V, Bedford FK, Lamarche-Vane N (2011) The activation of ezrin-radixin-moesin proteins is regulated by netrin-1 through Src kinase and RhoA/Rho kinase activities and mediates netrin-1-induced axon outgrowth. Mol Biol Cell 22:3734-3746.

Barnes AP, Lilley BN, Pan YA, Plummer LJ, Powell AW, Raines AN, Sanes JR, Polleux F (2007) LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons. Cell 129:549-563.

Bekkers JM, Suzuki N (2013) Neurons and circuits for odor processing in the piriform cortex. Trends Neurosci 36:429-438.

Bennett V, Lorenzo DN (2013) Spectrin- and ankyrin-based membrane domains and the evolution of vertebrates. Curr Top Membr 72:1-37.

Buttermore ED, Thaxton CL, Bhat MA (2013) Organization and maintenance of molecular domains in myelinated axons. J Neurosci Res 91:603-622.

Carney RS, Alfonso TB, Cohen D, Dai H, Nery S, Stoica B, Slotkin J, Bregman BS, Fishell G, Corbin JG (2006) Cell migration along the lateral cortical stream to the developing basal telencephalic limbic system. J Neurosci 26:11562-11574.

Castellani V, Chedotal A, Schachner M, Faivre-Sarrailh C, Rougon G (2000) Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. Neuron 27:237-249.

Cheng L, Itoh K, Lemmon V (2005) L1-mediated branching is regulated by two ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding sites, the RSLE region and a novel juxtamembrane ERM-binding region. J Neurosci 25:395-403.

Colavita A, Culotti JG (1998) Suppressors of ectopic UNC-5 growth cone steering identify eight genes involved in axon guidance in Caenorhabditis elegans. Dev Biol 194:72-85.

Cowan CA, Yokoyama N, Saxena A, Chumley MJ, Silvany RE, Baker LA, Srivastava D, Henkemeyer M (2004) Ephrin-B2 reverse signaling is required for axon pathfinding and cardiac valve formation but not early vascular development. Dev Biol 271:263-271.

Cummings DM, Malun D, Brunjes PC (1997) Development of the anterior commissure in the opossum: midline extracellular space and glia coincide with early axon decussation. J Neurobiol 32:403-414.

de Castro F (2009) Wiring Olfaction: The Cellular and Molecular Mechanisms that Guide the Development of Synaptic Connections from the Nose to the Cortex. Front Neurosci 3:52.

Demyanenko GP, Siesser PF, Wright AG, Brennaman LH, Bartsch U, Schachner M, Maness PF (2011) L1 and CHL1 Cooperate in Thalamocortical Axon Targeting. Cereb Cortex 21:401-412.

Falk J, Bechara A, Fiore R, Nawabi H, Zhou H, Hoyo-Becerra C, Bozon M, Rougon G, Grumet M, Puschel AW, Sanes JR, Castellani V (2005) Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. Neuron 48:63-75.

Georgakopoulos A, Litterst C, Ghersi E, Baki L, Xu C, Serban G, Robakis NK (2006) Metalloproteinase/Presenilin1 processing of ephrinB regulates EphB-induced Src phosphorylation and signaling. EMBO J 25:1242-1252.

Giger RJ, Cloutier JF, Sahay A, Prinjha RK, Levengood DV, Moore SE, Pickering S, Simmons D, Rastan S, Walsh FS, Kolodkin AL, Ginty DD, Geppert M (2000) Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. Neuron 25:29-41.

Gil OD, Sakurai T, Bradley AE, Fink MY, Cassella MR, Kuo JA, Felsenfeld DP (2003) Ankyrin binding mediates L1CAM interactions with static components of the cytoskeleton and inhibits retrograde movement of L1CAM on the cell surface. J Cell Biol 162:719-730.

Gottfried JA (2010) Central mechanisms of odour object perception. Nat Rev Neurosci 11:628-641.

Goutebroze L, Brault E, Muchardt C, Camonis J, Thomas G (2000) Cloning and characterization of SCHIP-1, a novel protein interacting specifically with spliced isoforms and naturally occurring mutant NF2 proteins. Mol Cell Biol 20:1699-1712.

Haas MA, Vickers JC, Dickson TC (2004) Binding partners L1 cell adhesion molecule and the ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins are involved in development and the regenerative response to injury of hippocampal and cortical neurons. Eur J Neurosci 20:1436-1444.

Henkemeyer M, Orioli D, Henderson JT, Saxton TM, Roder J, Pawson T, Klein R (1996) Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. Cell 86:35-46.

Herron LR, Hill M, Davey F, Gunn-Moore FJ (2009) The intracellular interactions of the L1 family of cell adhesion molecules. Biochem J 419:519-531.

Ho SK, Kovacevic N, Henkelman RM, Boyd A, Pawson T, Henderson JT (2009) EphB2 and EphA4 receptors regulate formation of the principal inter-hemispheric tracts of the mammalian forebrain. Neuroscience 160:784-795.

Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. Annu Rev Neurosci 24:677-736.

Kiryushko D, Berezin V, Bock E (2004) Regulators of neurite outgrowth: role of cell adhesion molecules. Ann N Y Acad Sci 1014:140-154.

Kunimoto M, Suzuki T (1995) Selective down-regulation of 440 kDa ankyrinB associated with neurite retraction. Neuroreport 6:2545-2548.

Lindwall C, Fothergill T, Richards LJ (2007) Commissure formation in the mammalian forebrain. Curr Opin Neurobiol 17:3-14.

Lustig M, Erskine L, Mason CA, Grumet M, Sakurai T (2001) Nr-CAM expression in the developing mouse nervous system: ventral midline structures, specific fiber tracts, and neuropilar regions. J Comp Neurol 434:13-28.

Mann F, Miranda E, Weinl C, Harmer E, Holt CE (2003) B-type Eph receptors and ephrins induce growth cone collapse through distinct intracellular pathways. J Neurobiol 57:323-336.

Marsick BM, Roche FK, Letourneau PC (2012a) Repulsive axon guidance cues ephrin-A2 and slit3 stop protrusion of the growth cone leading margin concurrently with inhibition of ADF/cofilin and ERM proteins. Cytoskeleton (Hoboken) 69:496-505.

Marsick BM, San Miguel-Ruiz JE, Letourneau PC (2012b) Activation of ezrin/radixin/moesin mediates attractive growth cone guidance through regulation of growth cone actin and adhesion receptors. J Neurosci 32:282-296.

Marston DJ, Dickinson S, Nobes CD (2003) Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph-ephrin contact repulsion. Nat Cell Biol 5:879-888.

Martin PM, Carnaud M, Garcia del Cano G, Irondelle M, Irinopoulou T, Girault JA, Dargent B, Goutebroze L (2008) Schwannomin-interacting protein-1 isoform IQCJ-SCHIP-1 is a late component of nodes of Ranvier and axon initial segments. J Neurosci 28:6111-6117.

Megason SG, McMahon AP (2002) A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. Development 129:2087-2098.

Mintz CD, Carcea I, McNickle DG, Dickson TC, Ge Y, Salton SR, Benson DL (2008) ERM proteins regulate growth cone responses to Sema3A. J Comp Neurol 510:351-366.

Moreau-Fauvarque C, Kumanogoh A, Camand E, Jaillard C, Barbin G, Boquet I, Love C, Jones EY, Kikutani H, Lubetzki C, Dusart I, Chedotal A (2003) The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion. J Neurosci 23:9229-9239.

Nishimura K, Yoshihara F, Tojima T, Ooashi N, Yoon W, Mikoshiba K, Bennett V, Kamiguchi H (2003) L1-dependent neuritogenesis involves ankyrinB that mediates L1-CAM coupling with retrograde actin flow. J Cell Biol 163:1077-1088.

Otsuka AJ, Franco R, Yang B, Shim KH, Tang LZ, Zhang YY, Boontrakulpoontawee P, Jeyaprakash A, Hedgecock E, Wheaton VI, et al. (1995) An ankyrin-related gene (unc-44) is necessary for proper axonal guidance in Caenorhabditis elegans. J Cell Biol 129:1081-1092.

Paglini G, Kunda P, Quiroga S, Kosik K, Caceres A (1998) Suppression of radixin and moesin alters growth cone morphology, motility, and process formation in primary cultured neurons. J Cell Biol 143:443-455.

Park E, Kim Y, Noh H, Lee H, Yoo S, Park S (2013) EphA/ephrin-A signaling is critically involved in region-specific apoptosis during early brain development. Cell Death Differ 20:169-180.

Parker M, Roberts R, Enriquez M, Zhao X, Takahashi T, Pat Cerretti D, Daniel T, Chen J (2004) Reverse endocytosis of transmembrane ephrin-B ligands via a clathrin-mediated pathway. Biochem Biophys Res Commun 323:17-23.

Piper M, Salih S, Weinl C, Holt CE, Harris WA (2005) Endocytosis-dependent desensitization and protein synthesis-dependent resensitization in retinal growth cone adaptation. Nat Neurosci 8:179-186.

Pires-Neto MA, Lent R (1993) The prenatal development of the anterior commissure in hamsters: pioneer fibers lead the way. Brain Res Dev Brain Res 72:59-66.

Sahay A, Molliver ME, Ginty DD, Kolodkin AL (2003) Semaphorin 3F is critical for development of limbic system circuitry and is required in neurons for selective CNS axon guidance events. J Neurosci 23:6671-6680.

Sarma AA, Richard MB, Greer CA (2011) Developmental dynamics of piriform cortex. Cereb Cortex 21:1231-1245.

Schlatter MC, Buhusi M, Wright AG, Maness PF (2008) CHL1 promotes Sema3A-induced growth cone collapse and neurite elaboration through a motif required for recruitment of ERM proteins to the plasma membrane. J Neurochem 104:731-744.

Schneider S, Gulacsi A, Hatten ME (2011) Lrp12/Mig13a reveals changing patterns of preplate neuronal polarity during corticogenesis that are absent in reeler mutant mice. Cereb Cortex 21:134-144.

Schulz A, Geissler KJ, Kumar S, Leichsenring G, Morrison H, Baader SL (2010) Merlin inhibits neurite outgrowth in the CNS. J Neurosci 30:10177-10186.

Scotland P, Zhou D, Benveniste H, Bennett V (1998) Nervous system defects of AnkyrinB (-/-) mice suggest functional overlap between the cell adhesion molecule L1 and 440-kD AnkyrinB in premyelinated axons. J Cell Biol 143:1305-1315.

Suzuki N, Bekkers JM (2006) Neural coding by two classes of principal cells in the mouse piriform cortex. J Neurosci 26:11938-11947.

Suzuki N, Bekkers JM (2011) Two layers of synaptic processing by principal neurons in piriform cortex. J Neurosci 31:2156-2166.

Tomita T, Tanaka S, Morohashi Y, Iwatsubo T (2006) Presenilin-dependent intramembrane cleavage of ephrin-B1. Mol Neurodegener 1:2.

Vanderhaeghen P, Cheng HJ (2010) Guidance molecules in axon pruning and cell death. Cold Spring Harb Perspect Biol 2:a001859.

Xu NJ, Henkemeyer M (2012) Ephrin reverse signaling in axon guidance and synaptogenesis. Semin Cell Dev Biol 23:58-64.

Yamauchi J, Miyamoto Y, Kusakawa S, Torii T, Mizutani R, Sanbe A, Nakajima H, Kiyokawa N, Tanoue A (2008) Neurofibromatosis 2 tumor suppressor, the gene induced by valproic acid, mediates neurite outgrowth through interaction with paxillin. Exp Cell Res 314:2279-2288.

Yang M, Crawley JN (2009) Simple behavioral assessment of mouse olfaction. Curr Protoc Neurosci Chapter 8:Unit 8 24.

Zimmer M, Palmer A, Kohler J, Klein R (2003) EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. Nat Cell Biol 5:869-878.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *Schip1*Δ10 adult mice display fiber tract defects, parlicularly severe in the AC. ***A***, AC organization in the horizontal section sketched on brain lateral view (upper left). OB, olfactory bulb; AON, anterior olfactory nucleus; LOT, lateral olfactory tract; Pir Cx, piriform cortex; ACa, anterior branch of the AC; ACp, posterior branch of the AC. Dashed lines delimit the Pir Cx. Dotted lines (i-iii) define the levels of the coronal sections presented in *C*. ***B***, Phase-contrast images of horizontal 500-µm thick adult brain sections. *Schip1*Δ10 (Δ10) mice display a reduced thickness of the ACa (white square brakets) and no ACp (arrowhead). ***C***, Adult brain coronal sections, from rostral to caudal regions, immunolabeled with anti-NF160 antibody (i to iii). The ACa (i, ii, arrows) appears reduced and the ACp (iii, arrowhead) is absent in Δ10 mice. The corpus callosum (CC) of Δ10 mice appears thinner at the midline as compared to WT mice (iii, white square brackets). ***D***, Quantification of results in *C* for ACa area. ***E***, Quantification of results in *C* for CC thickness at the midline. (***B***) N=3 animals/genotype. (***C-E***) N=3 animals/genotype, N=3 sections/animal. (***D-E***) Data are means ± SEM. Statistical analysis: Two-way ANOVA; **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, ns, not significant. Scale bars: (***B, C***), 500 µm.

Figure 2. *Schip1*Δ10 adult mice display a thinner posterior piriform cortex and behavioral abnormalities related to odor association dysfunction. ***A***, Adult brain coronal sections at the levels of the anterior (ANT) and the posterior (POST) piriform cortex (Pir Cx) immunolabeled with anti-calretinin (green) and anti-MAP-2 (red) antibodies, and stained with DAPI (blue). White dashed lines delineate layers (1a, 1b, 2, 3) and lateral olfactory tract (LOT). Δ10, *Schip1*Δ10 mice. ***B***, Pir Cx and primary somatosensory neocortex (Neocx) thicknesses in anterior (ANT) and posterior (POST) regions. ***C***, Odor discrimination and habituation assay. Adult female mice were exposed for 3 consecutive times to an odor filled cotton for 2 minutes (expositions 1 to 3) and the time spent sniffing the cotton was quantified.

Water was used as control odor, banana as food-attracting odor and urine from males as social odor. (***A, B***) N=3 animals/genotype, N=3 sections/animal. (***C***) N=12 females/genotype. (***B, C***) Data are means ± SEM. Statistical analyses: (***B***) t-test, ****p*<0.001; (***C***) Two-way ANOVA, **p*<0.05, ns, not significant. Scale bar: (***A***) 250 µm.

Figure 3. *Schip1*Δ10 mice display thinner piriform cortex layers of projection neurons from E16.5 on, with an increased cell death at E14.5. ***A***, Anterior (ANT) and posterior (POST) piriform cortex (Pir Cx) thicknesses during development, measured on cresyl violet-stained coronal sections. Δ10, *Schip1*Δ10 mice. ***B***, Cresyl violet staining of P0 brain coronal sections revealing the three-layered organization of the anterior (ANT) and posterior (POST) Pir Cx. White dashed lines delineate the layers (1, 2, 3). ***C***, Thickness of posterior Pir Cx layers at P0 (P0 POST) measured on cresyl violet-stained coronal sections as in *B*. ***D-E***, BrdU was injected in pregnant heterozygous females at 12.5 gestation and embryonic brain coronal sections were immunolabeled with anti-BrdU antibody (red) and stained with DAPI (grey), at E14.5. White dashed lines delineate the anatomical limits between the Pir Cx, the striatum (str) and the lateral olfactory tract (LOT). ***E***, Quantification of BrdU+ cell densities in total Pir Cx at E14.5. ***F***, Same as in *D* except that sections were prepared at E18.5. Pir Cx layers (1, 2, 3) and the striatum (str) are indicated. ***G***, Quantification of BrdU+ cell densities in layer 2 at E18.5. ***H,*** Quantification of cleaved caspase 3 immunopositive cell density at E14.5 in Pir Cx and neocortex (Neocx). (***A***) N=3-5 animals/genotype/age, N=3 sections/animal. (***B, C***) N=5 animals/genotype, N=3 sections/animal. (***D-H***) N=3 animals/genotype, N=3 sections/animal. (***A, C, E, G, H***) Data are means ± SEM. Statistical analyses: (***A, E, G, H***) Two-way ANOVA; (***C***) t-test; **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, ns, not significant. Scale bars: (***B***), 200 µm; (***D***), 50 µm; (***F***), 100 µm.

Figure 4. *Schip1*Δ10 embryos displayed early defects in the development of the AC. AC morphological analyses at E13.5, E14.5 and E16.5 embryonic stages. ***A,*** E13.5 coronal

brain sections immunolabeled with an anti-L1CAM antibody (red) and stained with DAPI (grey). Δ10, *Schip1*Δ10 embryos. (***b***), Higher magnification of boxed areas in *Aa*. AC axons detected in WT sections are indicated by an arrow. White dashed lines delineate the anatomical limits between the lateral olfactory tract (LOT), the striatum (str), and the ventricular and subventricular zones (vz/svz). ***B***, E14.5 coronal brain sections immunolabeled with an anti-L1CAM antibody. AC axons are visible at the midline in WT sections (arrow) but not in Δ10 sections. ***C***, E16.5 serial horizontal brain sections (i-ii) immunolabeled with an anti-L1CAM antibody. Both the ACa and the ACp cross the midline in WT brains. In Δ10 brains, the ACa is thinner (i-ii, arrows) and never reaches the midline whatever the section analyzed. ACp axons remain aligned with the cortex instead of projecting contralaterally (i-ii, ACp, arrowheads). ***D***, DiI injection in E16.5 fixed brains. (***a***), Schematic representation of DiI injection sites (red asterisks) in the anterior piriform cortex/ anterior olfactory nucleus (AON) to label ACa axons (***b***) and in the posterior piriform cortex (Pir Cx) to label the ACp axons (***c***). Dashed lines define the levels of the two horizontal sections (i-ii) presented in (*b*) and (*c*). (***Db, Dc***), Phase-contrast images presented with DiI labeling in pseudo-colors in serial horizontal sections (i, ii). Dashed white lines indicate brain midline. In WT brains both the ACa (***b***, arrows) and the ACp labeled axons reach the midline (***c***, arrowheads) and project to the contralateral hemisphere. In Δ10 brains the ACa is thinner and the labeled axons do not reach the midline (***b***, i-ii, arrows). Rare and short labeled axons arise from the posterior piriform cortex (***c***, i-ii, arrowheads). No labeling is visible in the contralateral hemisphere. ***E***, Schematic representation recapitulating AC defects in Δ10 brains as compared to WT brains at E16.5. The red arrows represent the measured distance between ACa axons and the midline. (***A-D***) Representative images of N=4 animals/genotype (***A-C***) and N=3 animals/genotype (***D***). Scale bars: (***A***), 250 µm; (***B***), 400 µm; (***C, D***), 500 µm.

Figure 5. *Schip1* is expressed in brain structures whose axons form the AC and in surrounding tissues during development. ***A-C****, In situ* hybridization on WT brain coronal

sections at E13.5, E14.5, and P0, using a riboprobe that allows the detection of all *Schip1* mRNA isoforms. At E13.5, *Schip1* is highly expressed in the anterior olfactory nucleus (AON), the piriform cortex (pir), the thalamus (thal), the striatum (st), the ventricular and subventricular zones (vz, svz), and the cortical plate (cp) (***A***). At E14.5 and P0, *Schip1* displays the same expression pattern as that observed at E13.5, with in addition expression in the hippocampus (hip) notably in the CA3 region (***B, C***) and in the amygdala (amy) (***C***). ***D***, No labeling was detected at P0 on *Schip1*Δ10 (Δ10) brain section. Scale bars: (***A-D***), 150 µm.

Figure 6. SCHIP-1 plays a role in axon initiation and outgrowth. ***A***, Schematic representation of the tissue used for explant axon growth experiments. E14.5 anterior and posterior piriform cortex (Pir Cx) were dissected and cultured separately. ***B***, Posterior cortical explants immunolabed with an anti-Tuj-1 antibody. White dotted lines outline axon growth area. Δ10, *Schip1*Δ10 embryos. ***C***, Axon growth area normalized to the explant area. N=10 embryos/genotype, 6 explants/embryo. ***D***, Morphological analyses of E14.5 Pir Cx dissociated neurons after one (DIV1) or 2 (DIV2) days in culture. Percentage of non-polarized neurons. DIV1, 3 embryos/genotype, DIV2, 10 embryos/genotype, 100 neurons/embryo. ***E***, Axon length measurements in neurons that elongated an axon immunolabeled with an anti-Tuj-1 antibody at DIV1. ***F***, Quantification of results in *E*, at DIV1 and 2. DIV1, 3 embryos/genotype, DIV2, 10 embryos/genotype, 100 neurons/embryo. ***G-I***, Immunolocalization of Flag tagged-SCHIP-1b expressed in WT dissociated Pir Cx neurons and detected with an anti-Flag antibody. Co-labeling with an anti-Tuj-1 antibody (***G, H***) or with phalloidin (***I***). (***H***), Higher magnification of box in *G*. (***C, D, F***) Data are means ± SEM. Statistical analysis: Mann-Whitney; **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001. Scale bars: (***B***), 200 µm; (***E, G***), 10 µm; (***H, I***), 5 µm.

Figure 7. Different participation of SCHIP-1 in guidance of ACa and ACp axons. ***A***, Schematic representation of explant co-cultures performed at E14.5. Explants from the anterior piriform cortex (ANT Pir Cx) or the posterior piriform cortex (POST Pir Cx) were co-cultured with lateral striatum explants (lat, str). ***B***, Qualitative evalutation of guidance index based on the density and the length of axons growing toward or away from the lateral striatum explant. Axons of cortical explants immunolabeled with anti-Tuj-1 display no repulsion (guidance index = 0), mild repulsion (guidance index = -1) or strong repulsion (guidance index = -2). Scale bar, 200 µm. ***C***, Quantification of the guidance responses of the anterior (ANT) and the posterior (POST) Pir Cx, N=10 embryos/genotype; 6 Pir Cx explants/embryo. Δ10, *Schip1*Δ10 embryos. Data are means ± SEM. Statistical analysis: Mann-Whitney; **p*<0.05, ns, not significant.

Figure 8. SCHIP-1 contributes to growth cone recovery after EphB2-induced collapse. ***A***, EphB2-Fc binds to piriform cortex growth cones. Cultures of piriform cortex dissociated neurons were incubated with EphB2-Fc for 10 minutes, and membrane-bound EphB2-Fc (lower panel) and actin (upper panel) were revealed by immunolabeling with an anti-Fc antibody on non-permeabilized cells together with phalloidin staining. On the lower panel white dashed lines outline phalloidin staining shown on the upper panel. ***B***, Percentage of collapsed growth cones after 10- or 30-minute incubation with Fc or EphB2-Fc. Δ10, *Schip1*Δ10 embryos. ***C***, Quantification of the number of membrane EphB2-Fc puncta in collapsed growth cones. (***B***, ***C***), N=6 embryos/genotype, 50 growth cones/embryo. ***D***, Time-lapse imaging of growth cone dynamics in the presence of EphB2-Fc for 15 minutes. Growth cones of WT and Δ10 neurons both collapse after ~10 minutes of EphB2-Fc incubation (t=10 min, arrows). WT growth cones then undergo a recovery response (t=12 min and t=15 min, arrowheads) whereas Δ10 growth cones remain collapsed (arrows). ***E, F***, Quantification of collapse onset (*E*) and distance of retraction traveled by growth cones during the 15 minutes of EphB2-Fc incubation (*F*). ***G***, Proportion of collapsed growth cones after 10 or 15 minutes

of incubation with EphB2-Fc. At each time point, the value 1 was given to collapsed growth cones, the value 0 to non-collapsed growth cones. The collapse index corresponds to the mean of these values. ***H***, Recovery response of growth cones after EphB2-Fc induced-collapse during the 15 minutes of acquisition. As for G, the value 1 was given to growth cones which displayed recovery, the value 0 to growth cones which did not recover at 15 minutes. The recovery index corresponds to the mean of these values. (***D, H***) N=6 embryos/genotype, 12 growth cones/embryo. (***B, C, E-H***) Data are means ± SEM. Statistical analyses: (***B***, ***C, E, F***) Mann-Whitney, asterisks (*) represent difference between genotypes, circles, (°) represent difference between control and EphB2 treatments, pound keys ($^{\#}$) represent difference between EphB2 incubation times; (***G, H***) Chi²; $^{*/\circ/\#}p<0.05$, $^{**/\circ\circ}p<0.01$, $^{\#\#\#}p<0.001$, ns, not significant. Scale bars: (***A, D***), 5 µm.

Table 1. *Schip1*Δ10 mice display decreased thickness of projection neuron layers in the piriform cortex.

	ANT piriform cortex		Post piriform cortex	
Thickness (µm)	WT	Δ10	WT	Δ10
LOT	96.8 ± 4.6	95.7 ± 3.5	110.7 ± 14.7	107.3 ± 10.7
Layer 1a	105.6 ± 2.6	105.4 ± 6.4	128.9 ± 16.4	98.3 ± 7.8
Layer 1b	42.1 ± 4.1	51.1 ± 2.5	69.0 ± 16.8	56.6 ± 5.8
Layer 2	121.4 ± 3.7	**97.9 ± 7.9***	165.0 ± 15.7	**103.2 ± 7.2****
Layer 3	228.0 ± 7.8	222.7 ± 5.1	274.4 ± 21.1	**167.5 ± 7.1***

Thickness measures of the lateral olfactory tract (LOT) and the piriform cortex layers (1a, 1b, 2 and 3) at the levels of anterior (ANT) and posterior (POST) piriform cortex in WT and *Schip1*Δ10 (Δ10) adult coronal brain sections. N=3 animals/genotype. Data are means ± SEM. Statistical analysis: t-test; *p<0.05, **p<0.001.

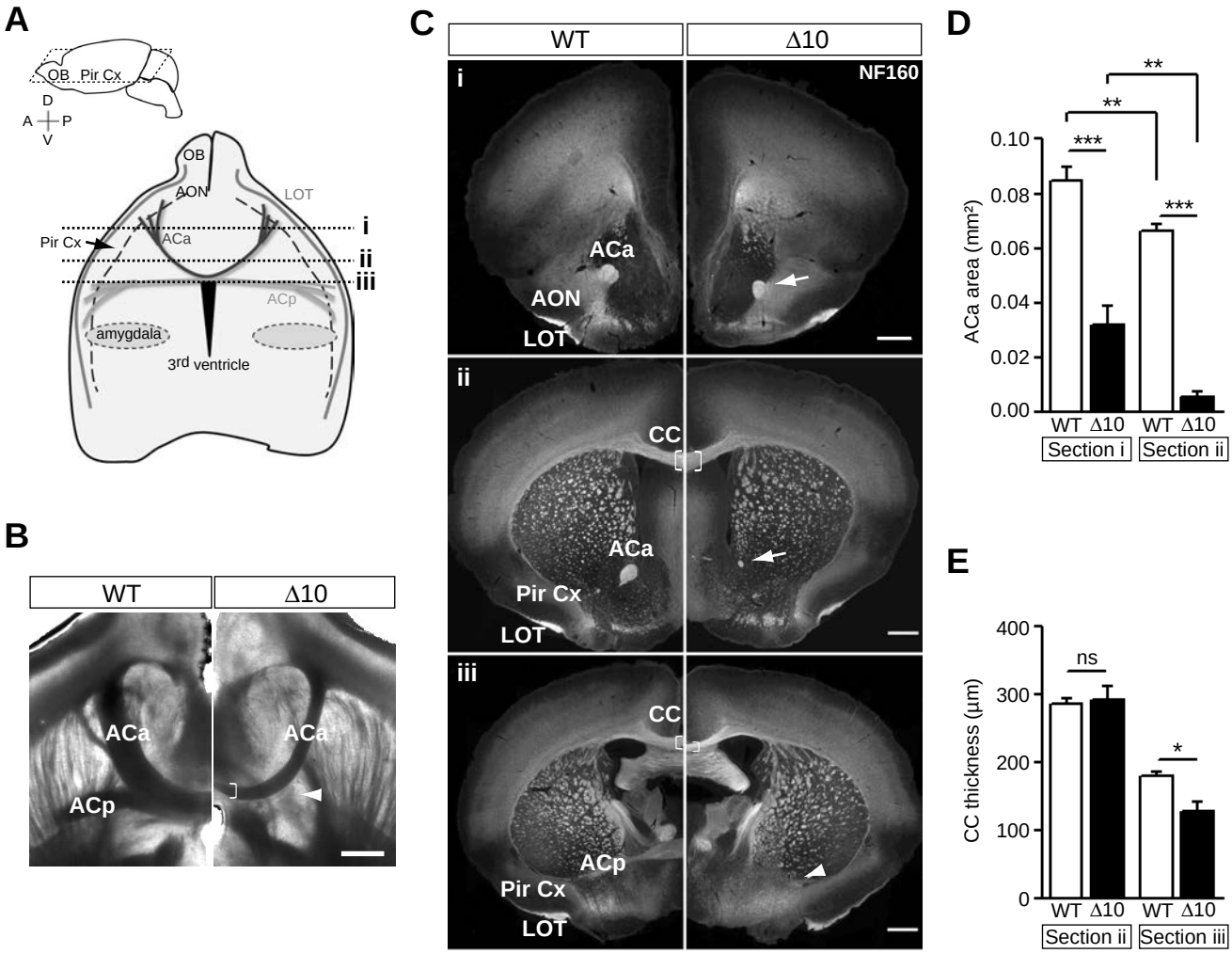

A
OB
Pir Cx
D
A
P
V
OB
AON
LOT
Pir Cx
ACa
i
ii
iii
ACp
amygdala
3rd ventricle
B
WT
Δ10
ACa
ACa
ACp
C
WT
Δ10
NF160
i
ACa
AON
LOT
ii
CC
ACa
Pir Cx
LOT
iii
CC
ACp
Pir Cx
LOT
D
ACa area (mm²)
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
**
**
***
***
WT Δ10 WT Δ10
Section i
Section ii
E
CC thickness (μm)
400
300
200
100
0
ns
*
WT Δ10 WT Δ10
Section ii
Section iii

Figure 1

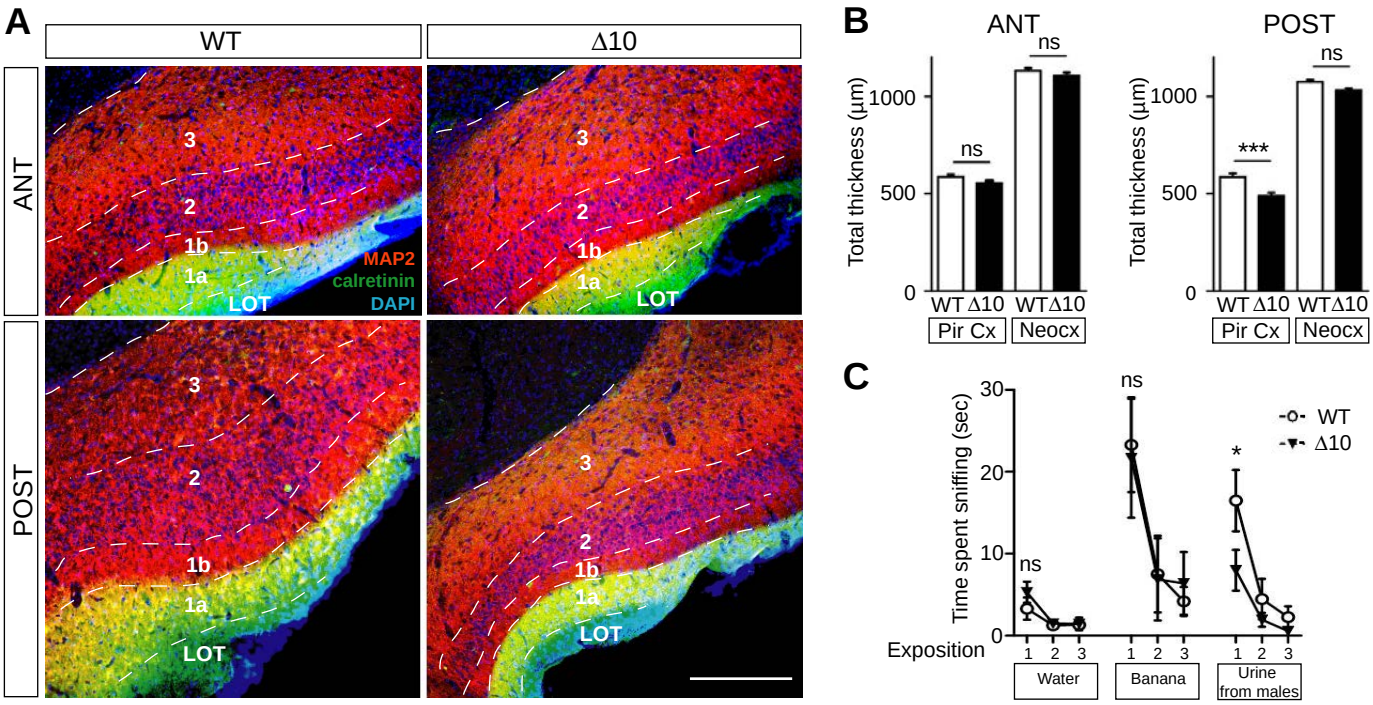

A
WT
Δ10
ANT
POST
3
2
1b
1a
LOT
MAP2
calretinin
DAPI
B
ANT
POST
Total thickness (µm)
1000
500
0
ns
***
WT Δ10 WT Δ10
Pir Cx
Neocx
C
Time spent sniffing (sec)
30
20
10
0
Exposition
1 2 3
Water
Banana
Urine from males
WT
Δ10
*

Figure 2

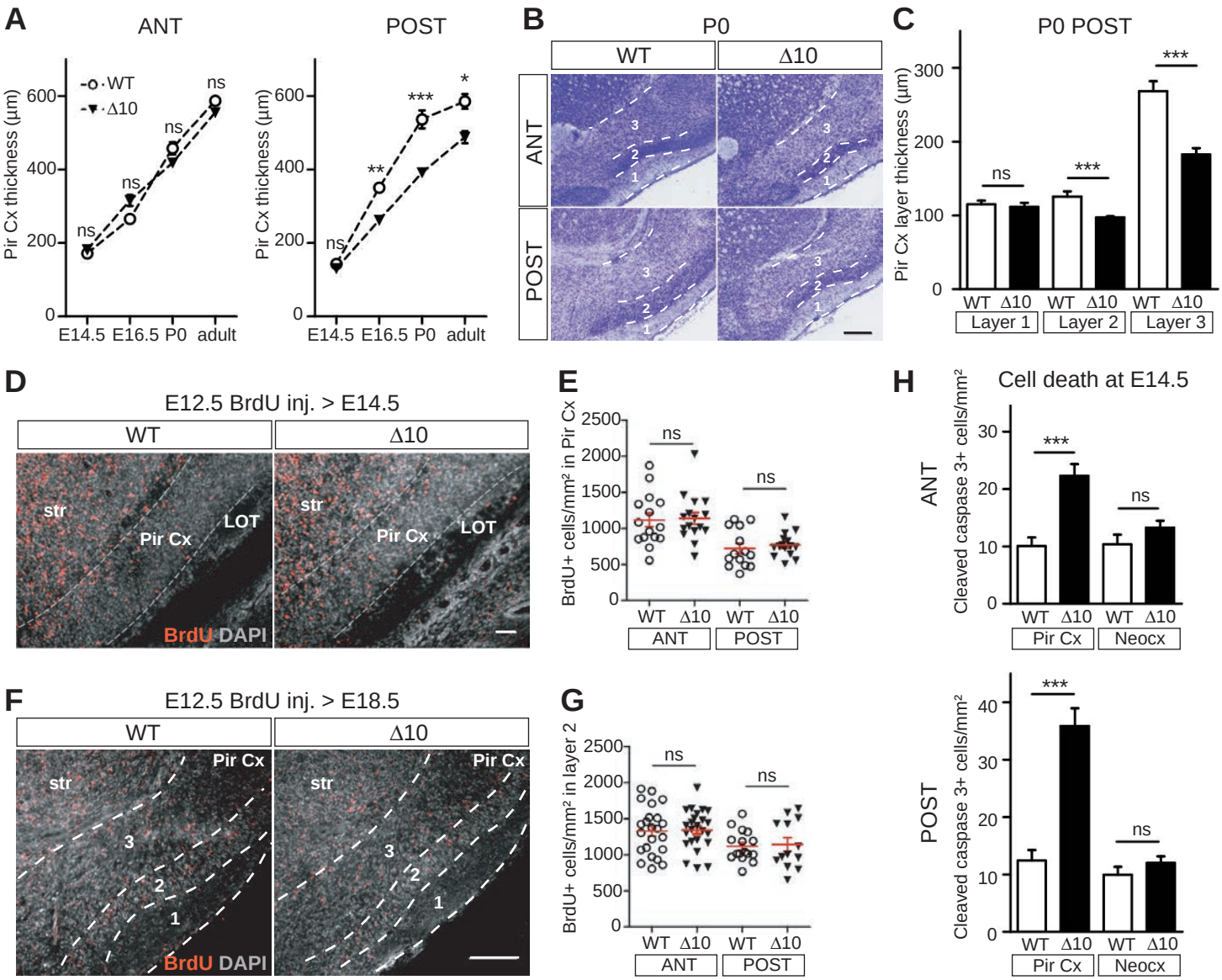

A
ANT
POST
WT
Δ10
Pir Cx thickness (µm)
E14.5 E16.5 P0 adult
B
P0
WT
Δ10
ANT
POST
C
P0 POST
Pir Cx layer thickness (µm)
Layer 1
Layer 2
Layer 3
D
E12.5 BrdU inj. > E14.5
str
Pir Cx
LOT
BrdU DAPI
E
BrdU+ cells/mm² in Pir Cx
H
Cell death at E14.5
Cleaved caspase 3+ cells/mm²
Pir Cx
Neocx
F
E12.5 BrdU inj. > E18.5
G
BrdU+ cells/mm² in layer 2

Figure 3

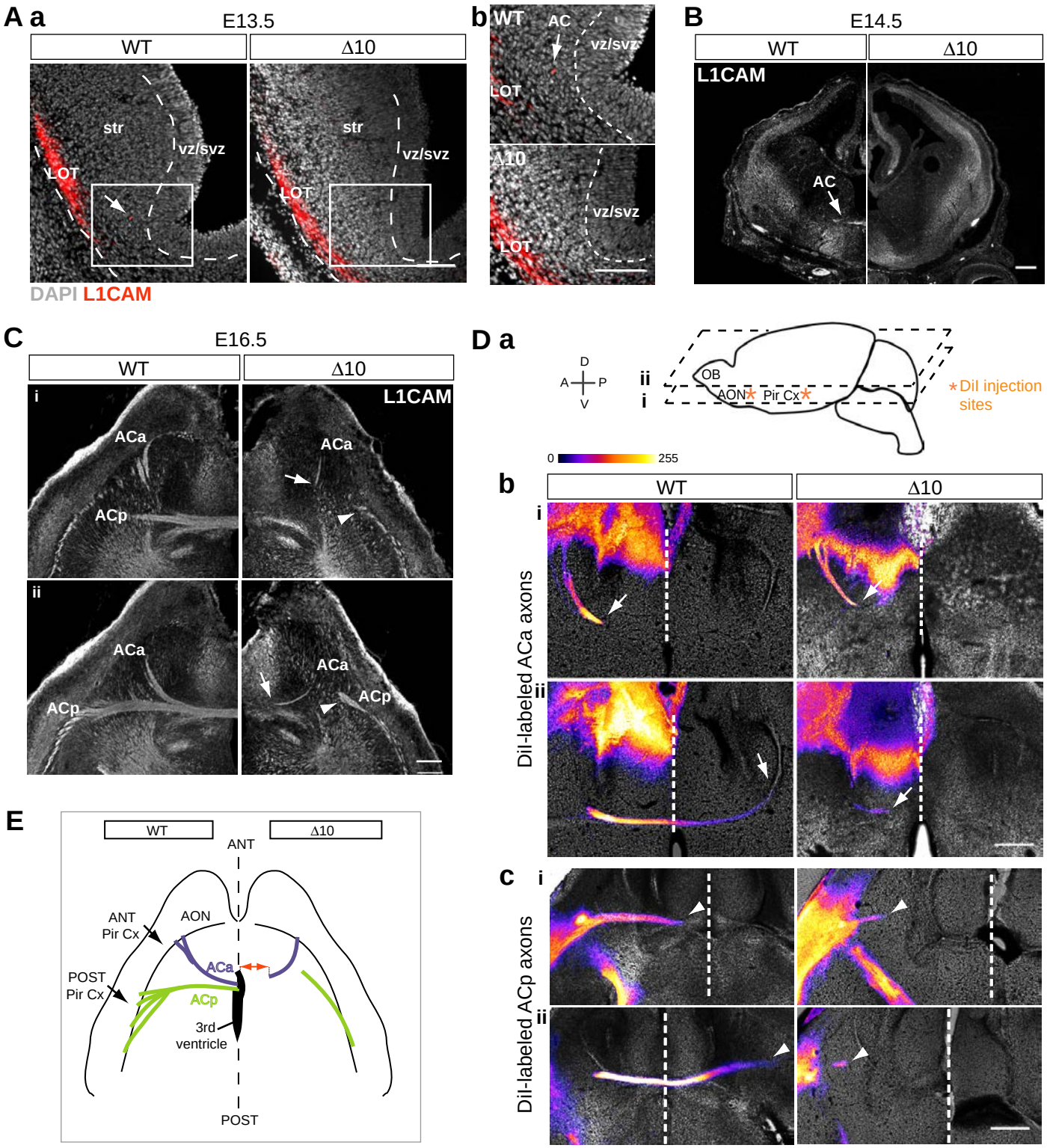

A a
E13.5
WT
Δ10
str
vz/svz
LOT
DAPI L1CAM
b
WT
AC
vz/svz
LOT
Δ10
B
E14.5
L1CAM
C
E16.5
i
ii
ACa
ACp
D a
D
A
P
V
OB
AON
Pir Cx
*DiI injection sites
0
255
b
Dil-labeled ACa axons
c
Dil-labeled ACp axons
E
ANT
ANT Pir Cx
AON
POST Pir Cx
3rd ventricle
POST

Figure 4

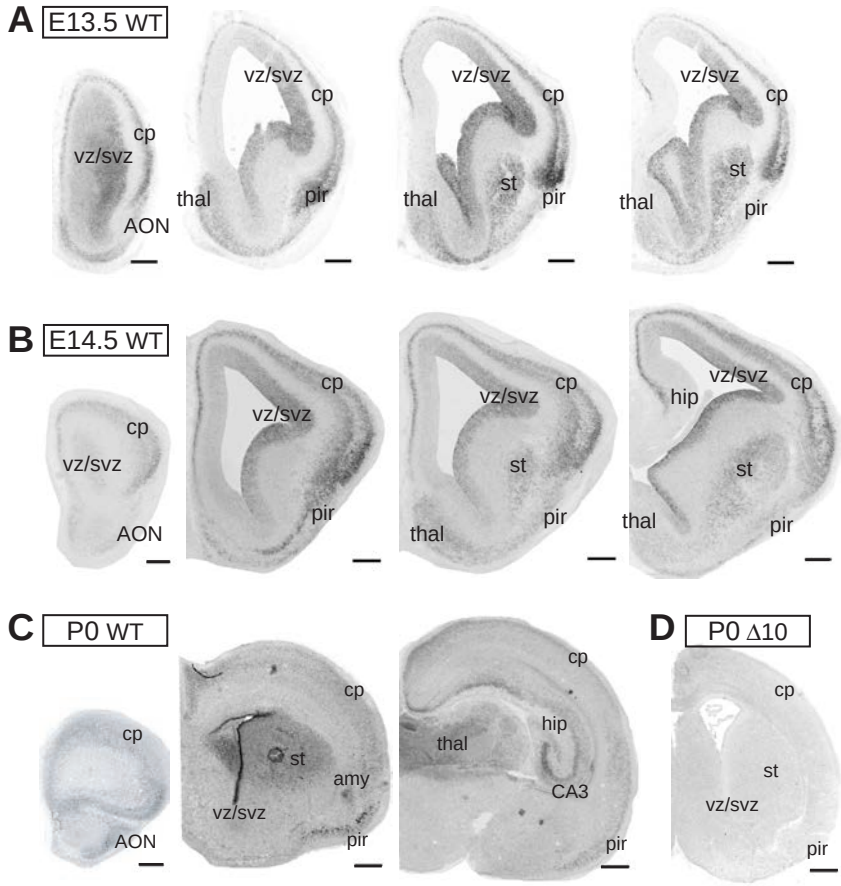

A
E13.5 WT
cp
vz/svz
AON
vz/svz
cp
thal
pir
vz/svz
cp
st
thal
pir
vz/svz
cp
st
thal
pir
B
E14.5 WT
cp
vz/svz
AON
cp
vz/svz
pir
vz/svz
cp
st
thal
pir
vz/svz
cp
hip
st
thal
pir
C
P0 WT
cp
AON
cp
st
amy
vz/svz
pir
cp
hip
thal
CA3
pir
D
P0 Δ10
cp
st
vz/svz
pir

Figure 5

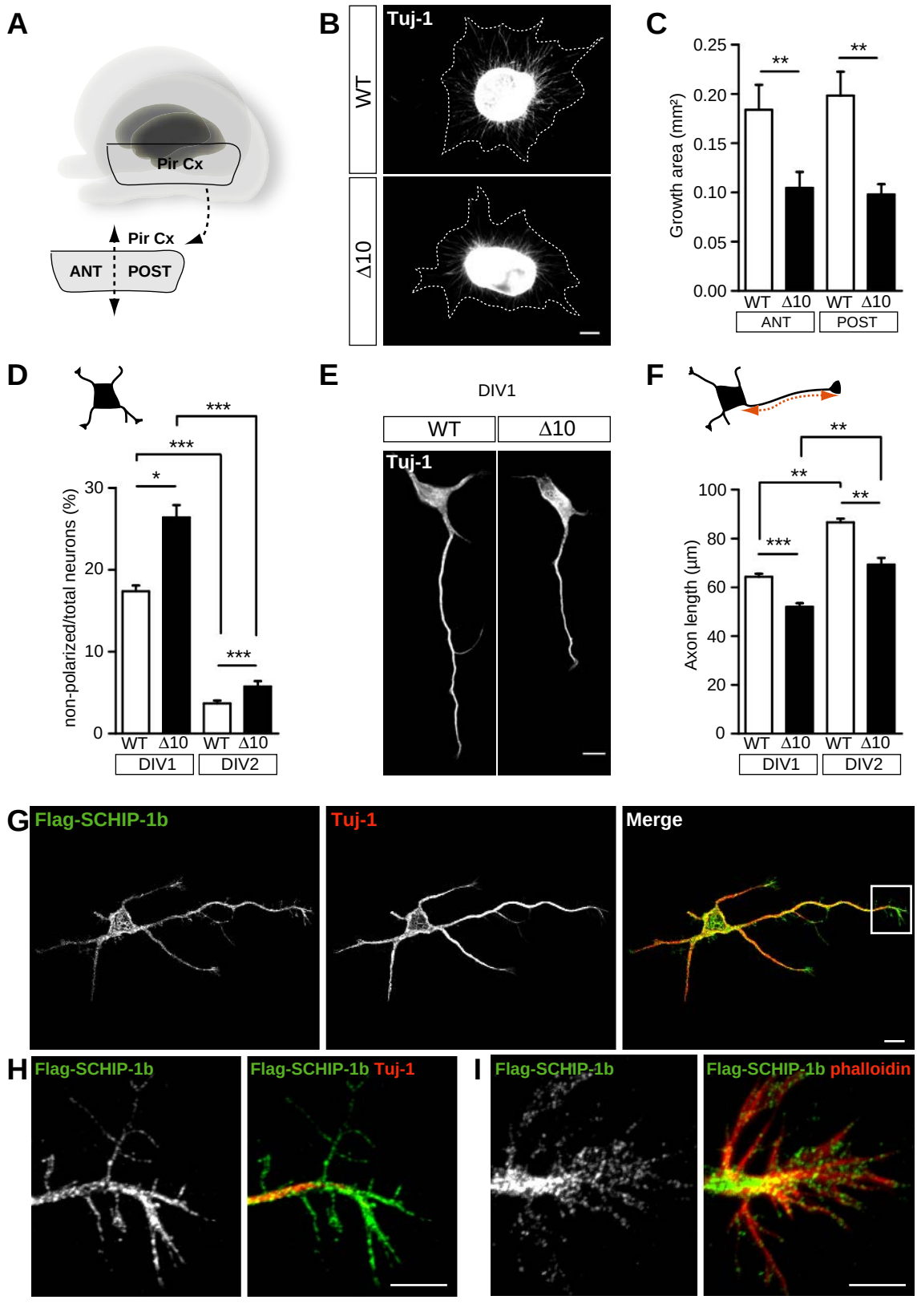

A
Pir Cx
Pir Cx
ANT
POST
B
WT
Δ10
Tuj-1
C
Growth area (mm²)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
**
**
WT Δ10 WT Δ10
ANT
POST
D
non-polarized/total neurons (%)
30
20
10
0
*
***
***
***
WT Δ10 WT Δ10
DIV1
DIV2
E
DIV1
WT
Δ10
Tuj-1
F
Axon length (μm)
100
80
60
40
20
0
**
**
**
***
WT Δ10 WT Δ10
DIV1
DIV2
G
Flag-SCHIP-1b
Tuj-1
Merge
H
Flag-SCHIP-1b
Flag-SCHIP-1b Tuj-1
I
Flag-SCHIP-1b
Flag-SCHIP-1b phalloidin

Figure 6

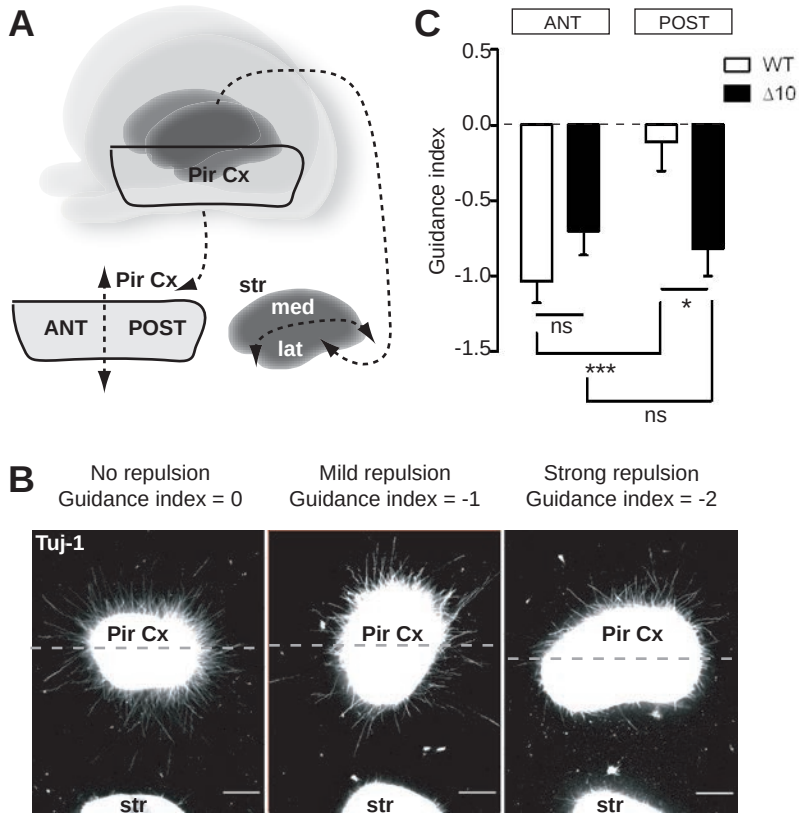

A
Pir Cx
Pir Cx
ANT
POST
str
med
lat
C
ANT
POST
WT
Δ10
Guidance index
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
ns
*
***
ns
B
No repulsion
Guidance index = 0
Mild repulsion
Guidance index = -1
Strong repulsion
Guidance index = -2
Tuj-1
Pir Cx
Pir Cx
Pir Cx
str
str
str

Figure 7

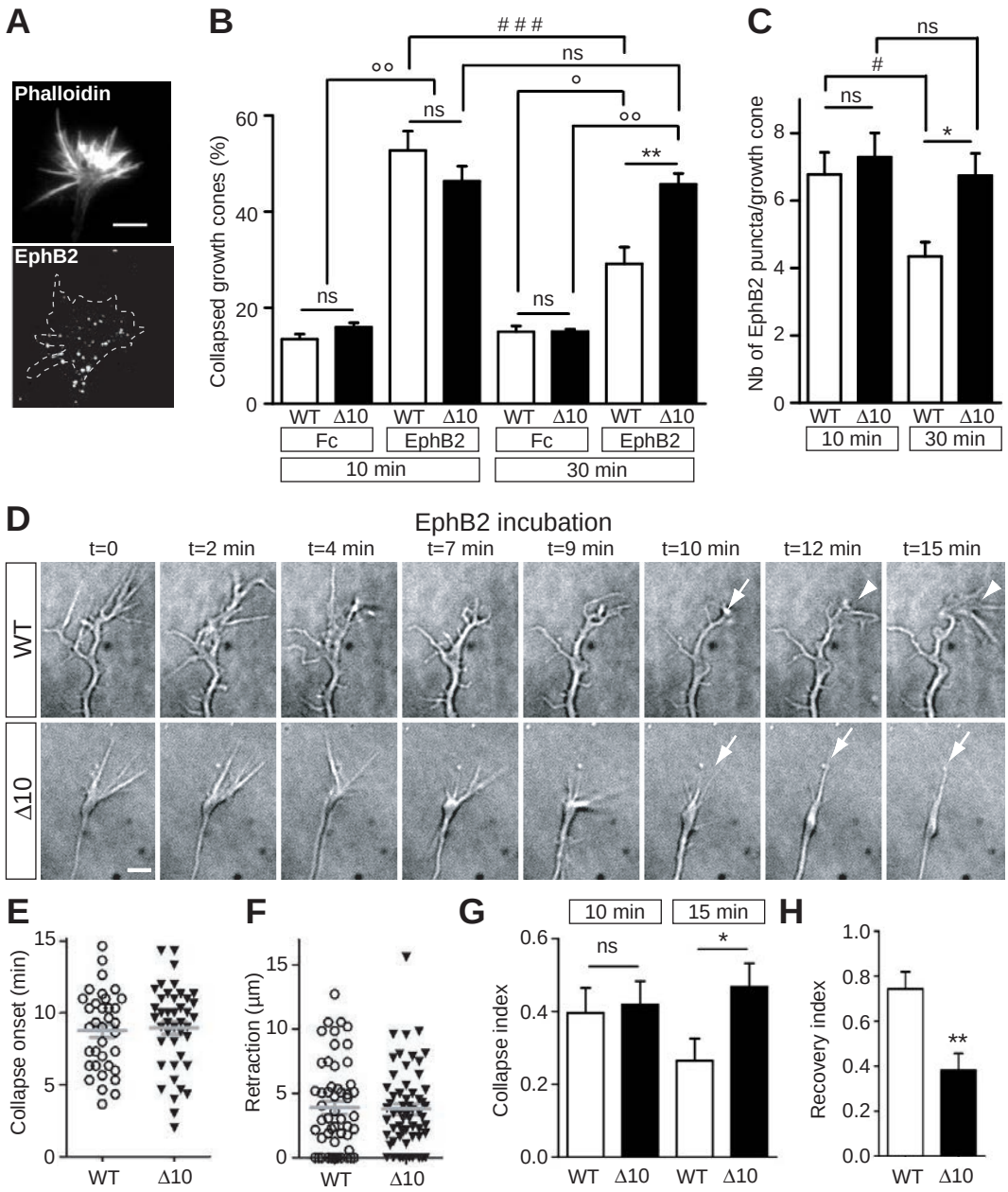

A
Phalloidin
EphB2
B
Collapsed growth cones (%)
WT Δ10 WT Δ10 WT Δ10 WT Δ10
Fc EphB2 Fc EphB2
10 min 30 min
C
Nb of EphB2 puncta/growth cone
WT Δ10 WT Δ10
10 min 30 min
D
EphB2 incubation
t=0 t=2 min t=4 min t=7 min t=9 min t=10 min t=12 min t=15 min
WT
Δ10
E
Collapse onset (min)
WT Δ10
F
Retraction (µm)
WT Δ10
G
10 min 15 min
Collapse index
WT Δ10 WT Δ10
H
Recovery index
WT Δ10

Figure 8

II. RESULTATS NON PUBLIES

A. Données supplémentaires sur les rôles de SCHIP-1 dans la croissance, le guidage et la maturation des axones

1. Expression de la neuropiline 2 par les neurones du cortex piriforme et réponse à la sémaphorine 3F

Nos résultats indiquaient un rôle de SCHIP-1 dans la réponse à la molécule de guidage répulsive EphB2, importante pour le développement de la commissure antérieure (CA). Les données de la littérature montrent que d'autres molécules de guidage répulsives participent au développement de cette structure. Nous avons évalué si SCHIP-1 participait à la réponse à d'autres molécules de guidage répulsives, en investiguant son rôle dans la réponse à la Séma3F, exprimée par le striatum au cours du développement (Sahay et al., 2003). Les souris invalidées pour l'expression de la Séma3F ou de son récepteur neuropiline 2 (Npn2) présentent des altérations de la CA fortement similaires aux défauts observés chez les souris mutées *Schip1*Δ10 (Chen et al., 2000; Giger et al., 2000; Sahay et al., 2003) (cf Introduction Figure 46, p. 74). Les axones de la CA expriment la molécule d'adhésion NrCAM qui participe à la réponse à la Séma3F *via* son interaction avec la Npn2 (Falk et al., 2005; Lustig et al., 2001). Dans les cultures de cortex piriforme que nous avons développées, la majorité des neurones exprime NrCAM. Ces cultures paraissaient, de fait, un modèle approprié pour notre étude.

Nous avons dans un premier temps évalué l'expression de la Npn2 par les neurones du cortex piriforme en culture à E14.5, grâce à des immunomarquages avec des anticorps anti-NrCAM et anti-Npn2 (R&D, #AF67) après deux jours en culture. Nous avons observé que certains neurones expriment effectivement la Npn2, dans les cultures établies à partir d'embryons WT ou *Schip1*Δ10 (Figure 1, *A*). Cependant, alors que la majorité des neurones du cortex piriforme exprime NrCAM, seule une faible proportion exprime la Npn2 (Figure 1, *B*). La très grande majorité des neurones exprimant Npn2 co-exprime NrCAM. Les proportions de neurones exprimant NrCAM, Npn2 et co-exprimant NrCAM et Npn2 sont identiques dans les cultures d'embryons WT et mutés. De manière intéressante, la proportion de neurones exprimant la Npn2 est plus élevée dans les cultures de la région postérieure du cortex piriforme que dans les cultures de la région antérieure (Figure 1, *B*).

Dans la mesure où nous avions montré que la croissance axonale de la population neuronale globale du cortex piriforme est diminuée chez les embryons *Schip1*Δ10, nous avons dans un deuxième temps déterminé si la croissance était altérée de la même façon pour les neurones exprimant ou n'exprimant pas la Npn2. Nous avons observé que les neurones co-exprimant NrCAM et Npn2 présentent des axones plus longs que les neurones n'exprimant que NrCAM, au même stade de culture (Figure 1, *C*, *D*). Cependant, que les neurones expriment ou n'expriment pas Npn2, leur croissance axonale est réduite dans les cultures d'embryons mutés à 2 et 4 jours en culture (Figure 1, *C*, *D*). Ces résultats indiquent que le rôle de SCHIP-1 dans l'élongation axonale est indépendant de l'expression de la Npn2 par les neurones.

Bien qu'une faible proportion de neurones expriment la Npn2 dans les conditions de culture que nous avons établies, nous avons étudié la réponse des cônes de croissance de ces neurones en présence de Séma3F couplée à un fragment Fc (R&D systems, #3237-S3-025 ; 250ng/mL) ou du fragment Fc seul comme contrôle (Rockland, #009-0103), à deux jours de culture. Après 30 minutes d'incubation, nous avons observé que les cônes de croissance collapsent en réponse à la Séma3F lorsque les neurones expriment la Npn2 (Figure 2, *A*). La proportion de cônes collapsés exprimant Npn2 est similaire dans les cultures de neurones WT et mutés (environ 45% de cônes collapsés) (Figure 2, *B*). Par contre, après 10 minutes d'incubation, les cultures d'embryons mutés présentent un pourcentage de cônes collapsés significativement plus élevé que les cultures WT (Figure 2, *B*). Les cônes de croissance de neurones mutés répondraient donc plus rapidement à la Séma3F que les cônes WT. Ces résultats suggèrent que SCHIP-1 pourrait également participer à la réponse des cônes de croissance à la Séma3F, et plus particulièrement jouer un rôle dans la dynamique de cette réponse.

2. Maturation axonale, localisation de NrCAM et formation du segment initial

SCHIP-1 est concentrée au segment initial de l'axone et aux nœuds des fibres myélinisées (Martin et al., 2008). L'étude des nerfs sciatiques des souris *Schip1*Δ10 a montré qu'elle est impliquée dans l'organisation structurale des nœuds mais n'est pas nécessaire pour l'enrichissement des complexes moléculaires comprenant les canaux Na_v (Article annexe 1). Le rôle de SCHIP-1 dans l'organisation du segment initial n'a pas été étudié. NrCAM est un composant majeur des complexes moléculaires du segment initial, où elle interagit avec l'ankyrine G. Cependant, les mécanismes permettant son accumulation au segment initial au cours du développement sont peu connus (Dzhashiashvili et al., 2007). Les immunomarquages réalisés avec les anticorps anti-NrCAM pour la caractérisation des cultures de cortex piriforme WT indiquaient que la localisation de NrCAM variait au cours de la maturation neuronale. NrCAM semblait préférentiellement localisée le long des neurites et aux cônes de croissance aux stades précoces de culture, puis concentrée aux segments initiaux des axones aux stades plus tardifs. Les cultures de cortex piriforme nous ont donc parues appropriées pour investiguer la localisation précise de NrCAM au cours de la maturation neuronale d'une part, et le rôle potentiel de SCHIP-1 dans la formation du segment initial d'autre part.

Nous avons dans un premier temps analysé la localisation de NrCAM en réalisant des immunomarquages de neurones WT fixés. Nous avons observé qu'après deux jours en culture, NrCAM est localisée dans les corps cellulaires, le long des neurites et enrichie aux cônes de croissance (Figure 3, DIV2, flèches). Cependant, certains neurones plus matures, dont l'axone est déjà particulièrement long, présentent un enrichissement de NrCAM au segment initial (Figure 3, DIV2, têtes de flèche). Entre 2 et 4 jours en culture, l'intensité du marquage NrCAM dans l'axone distal et au cône de croissance diminue fortement (Figure 3, DIV4, flèches) et NrCAM est enrichie au segment initial de l'axone (Figure 3, DIV4, têtes de flèche). Après 6 jours en culture, NrCAM est à peine détectable dans l'axone distal (Figure 3, DIV6, flèches) et concentrée au

segment initial de l'axone (Figure 3, DIV6, têtes de flèche). Des immunomarquages réalisés sur cellules vivantes ont confirmé la dynamique de localisation de NrCAM à la membrane au cours des différents stades de culture (Figure 4). L'ensemble de ces résultats montre que NrCAM est d'abord concentrée aux cônes de croissance et fortement présente le long des neurites et dans le corps cellulaire. Au cours de la maturation neuronale, NrCAM disparaît des régions distales de l'axone et des autres neurites, pour n'être détectable qu'au segment initial de l'axone.

Afin d'investiguer un rôle potentiel de SCHIP-1 dans la localisation de NrCAM au cours de la maturation axonale, nous avons d'abord analysé la localisation de NrCAM aux cônes de croissance de neurones dissociés de cortex piriforme WT et *Schip1*Δ10, après deux jours en culture. L'intensité de NrCAM aux cônes de croissance est plus faible dans les cônes de neurones mutés que dans les cônes de neurones WT (Figure 5, *A*). Nous avons ensuite estimé l'enrichissement de NrCAM au segment initial de l'axone en calculant le ratio de l'intensité de NrCAM au segment initial divisée par l'intensité de NrCAM dans l'axone distal. A deux comme à quatre jours en culture, ce rapport est plus faible dans les neurones mutés que dans les neurones WT (Figure 5, *B*). Les intensités normalisées montrent qu'à deux jours en culture, l'intensité de NrCAM est diminuée dans le segment initial et dans la partie distale de l'axone dans les neurones mutés (Figure 5, *C*). A quatre jours en culture, l'intensité de NrCAM au segment initial de l'axone des neurones mutés est identique à celle des neurones WT. Par contre, l'intensité de NrCAM dans l'axone distal des neurones mutés semble augmentée comparée à celle des neurones WT (Figure 5, *C*). L'ensemble de ces résultats suggère qu'aux stades précoces de développement, les neurones mutés expriment moins NrCAM que les neurones WT. Après quatre jours en culture, l'enrichissement en NrCAM du segment initial de l'axone n'est pas affecté dans les neurones mutés, mais la disparition de NrCAM dans l'axone distal semble diminuée par rapport aux neurones WT.

Afin de vérifier si l'accumulation de NrCAM était bien le reflet de la formation d'un segment initial, nous avons analysé la présence de deux autres composants majeurs du segment initial, l'ankyrine G et les canaux Na_v. Après quatre jours en culture, certains neurones WT présentent une accumulation de l'ankyrine G et des canaux Na_v au segment initial de l'axone (Figure 4, *C*, *D*). Nous avons également pu observer ces protéines au segment initial des neurones mutés (Figure 4, *E*, *F*). Après six jours en culture, l'ankyrine G et les canaux Na_v sont concentrés au segment initial dans la majorité des neurones. Ces résultats suggèrent que la mutation *Schip1*Δ10 n'empêcherait pas la formation du segment initial, cette conclusion étant cohérente avec la localisation tardive de SCHIP-1 aux segments initiaux par rapport à l'ankyrine G observée précédemment *in vitro* (Martin et al., 2008). Par ailleurs, les anomalies de localisation de NrCAM pourraient être le reflet d'un défaut de maturation axonale des neurones mutés *Schip1*Δ10, et/ou la conséquence d'un rôle de SCHIP-1 dans la localisation subcellulaire de NrCAM.

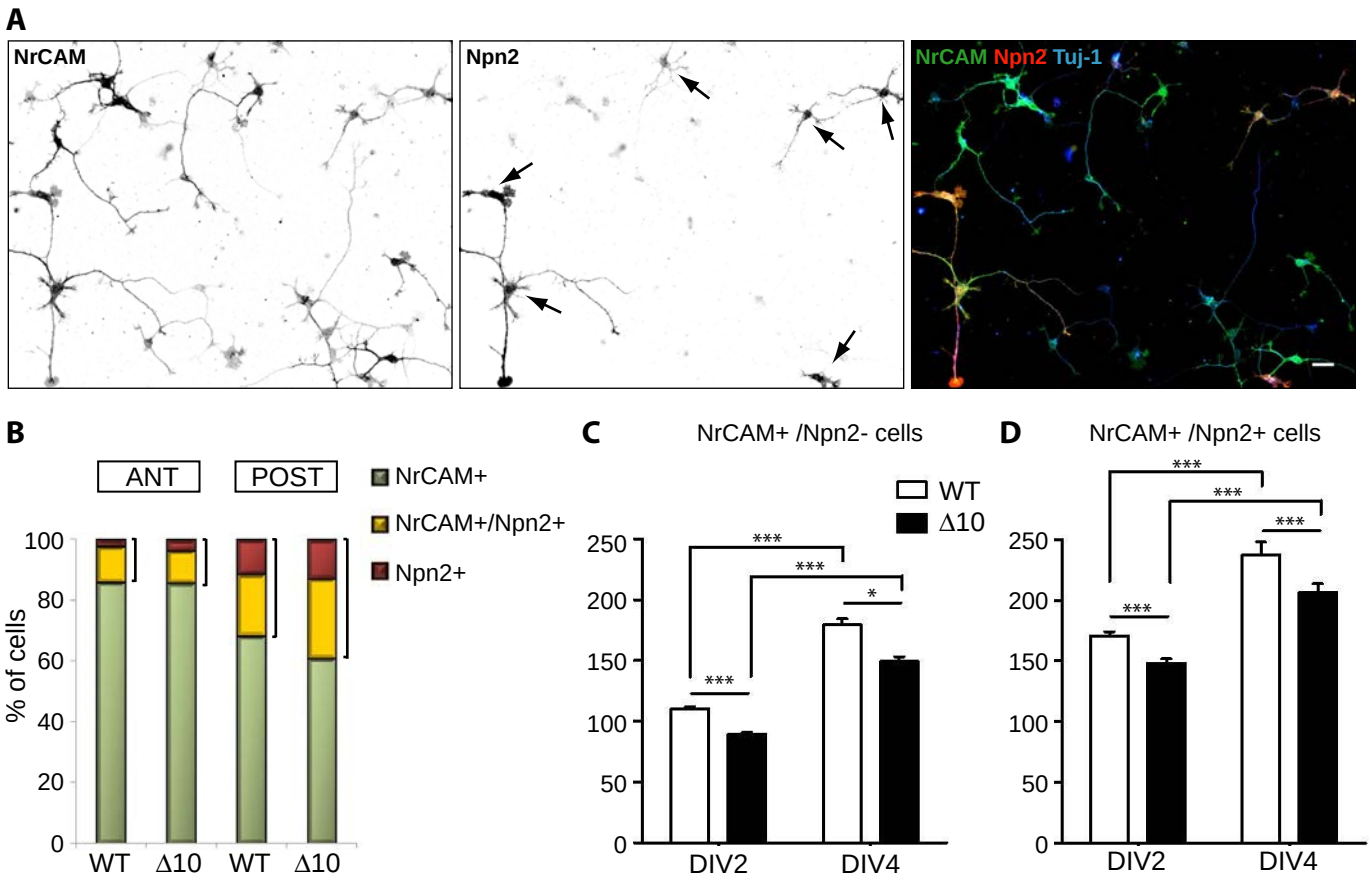


Figure 1 | Expression de la neuropiline 2 par les neurones de cortex piriforme en culture et croissance axonale. ***A***, Immunomarquage de neurones de cortex piriforme d'embryon WT à E14.5, après 2 jours en culture (DIV2), avec des anticorps anti-NrCAM, anti-neuropiline 2 (Npn2) et anti-Tuj-1. Les flèches montrent les neurones exprimant Npn2. ***B***, Quantifications des pourcentages de neurones exprimant NrCAM, Npn2 et co-exprimant NrCAM et Npn2 dans des cultures de cortex piriforme antérieur (ANT) et postérieur (POST) d'embryons WT et *Schip1*Δ10 (Δ10) à DIV2. ***C***, ***D***, Croissance axonale des neurones exprimant seulement NrCAM (*C*) ou co-exprimant NrCAM et Npn2 (*D*). Analyses statistiques, Mann-Whitney ; **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 ; N=5 embryons/génotype, 100 neurones totaux (Npn2+ et Npn2-)/embryon. Barre d'échelle, 25 µm.

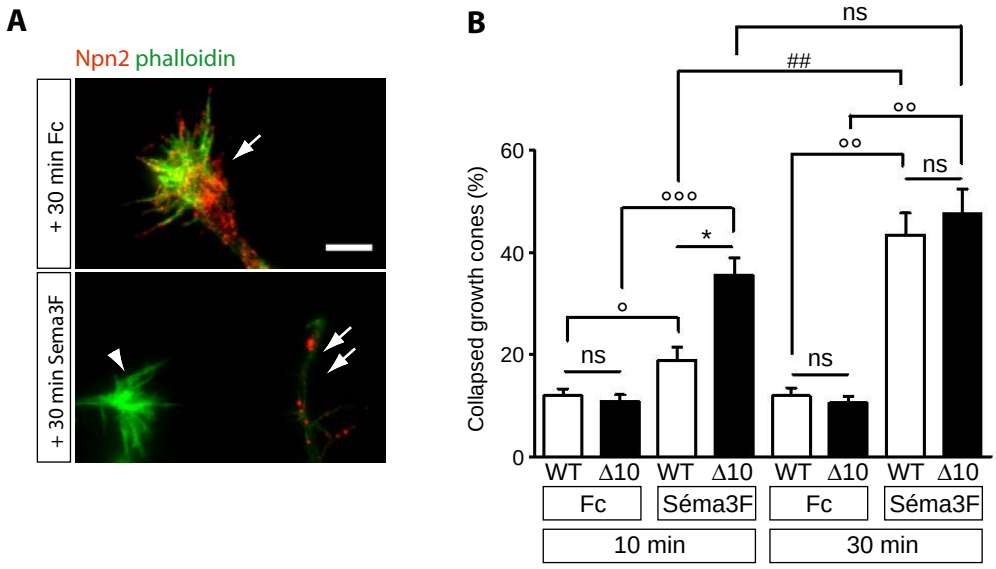


Figure 2 | Rôle de SCHIP-1 dans la réponse à la sémaphorine 3F. ***A***, Immunomarquages de neurones de cortex piriforme WT à DIV2 avec un anticorps anti-neuropiline 2 (Npn2) et co-marquage avec la phalloidine, après 30 minutes de traitement contrôle (fragment Fc seul) ou sémaphorine 3F (Séma3F, 250 ng/mL). Les cônes de croissance de neurones exprimant Npn2 sont montrés par une flèche. Les cônes positifs pour Npn2 répondent à la Séma3F (double-flèche), alors que les cônes négatifs pour Npn2 ne répondent pas (tête de flèche). ***B***, Quantification du pourcentage de cônes de croissance positifs pour Npn2 collapsés après 10 et 30 minutes d'incubation avec le fragment Fc seul ou la Séma3F, dans des cultures de neurones WT et *Schip1*Δ10 (Δ10). Analyses statistiques, Mann-Whitney ; les différences entre génotypes sont représentées par des astérisques (*), les différences entre traitements (Fc/Séma3F) par des cercles (°), les différences entre les durées de traitement (10/30 minutes) par des dièses (#) ; $^{*/°}p<0.05$, $^{°°/\#\#}p<0.01$, $^{°°°}p<0.001$; ns, non significatif. N=6 embryons/génotype, 100 cônes de croissance/embryon. Barre d'échelle, 5 µm.

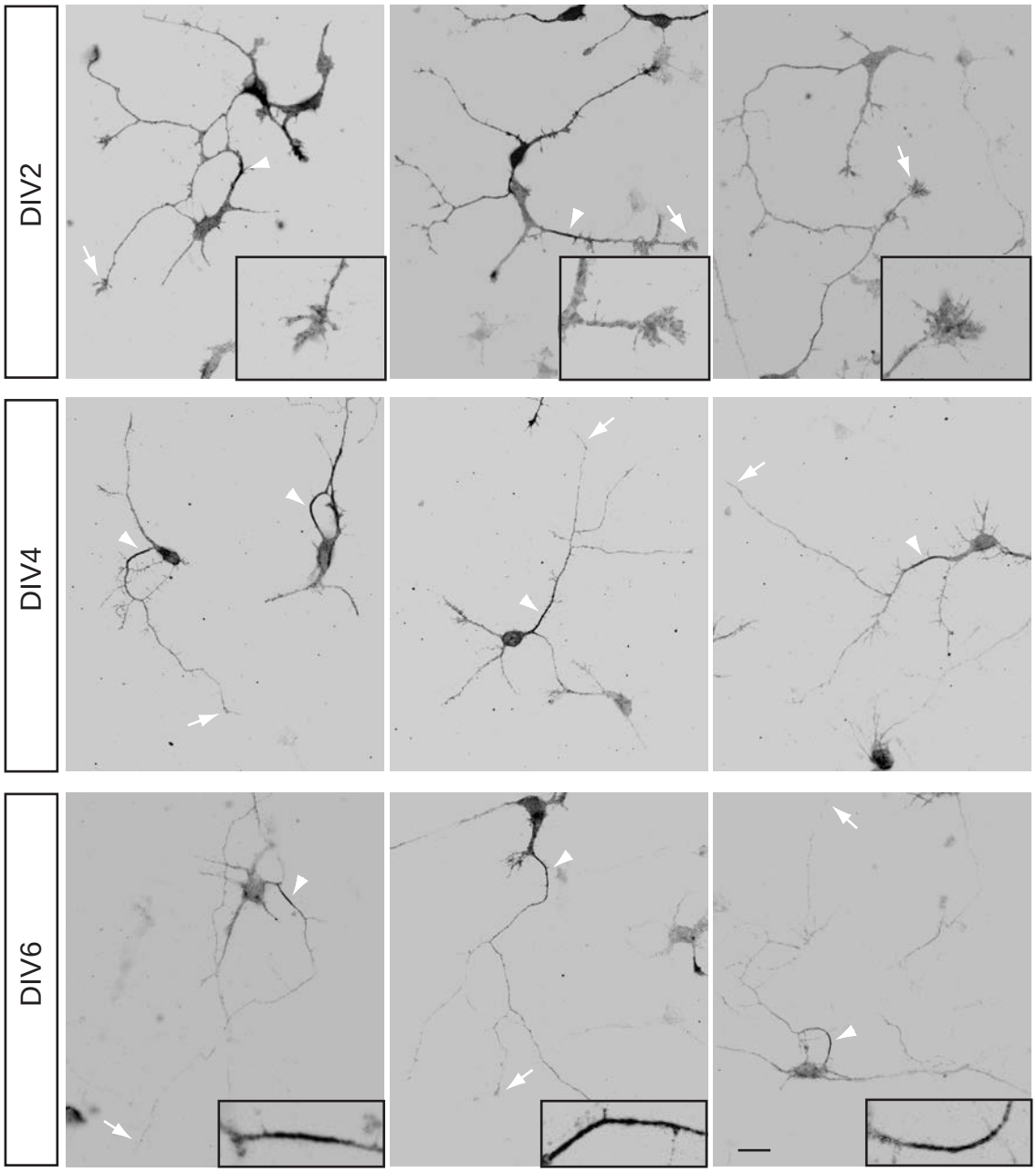


Figure 3 | Localisation de NrCAM et maturation neuronale, immunomarquages sur cellules perméabilisées. Neurones dissociés de cortex piriforme à E14.5 immunomarqués avec un anticorps anti-NrCAM après fixation et perméabilisation à deux jours (DIV2), quatre jours (DIV4) et six jours (DIV6) en culture. Les flèches montrent la localisation de NrCAM aux cônes de croissance, agrandis dans les encadrés noirs en bas à droite de chaque image à DIV2. Les têtes de flèche montrent la localisation de NrCAM au segment initial de l'axone, agrandis dans les encadrés noirs en bas à droite de chaque image à DIV6. Barre d'échelle, 20 µm.

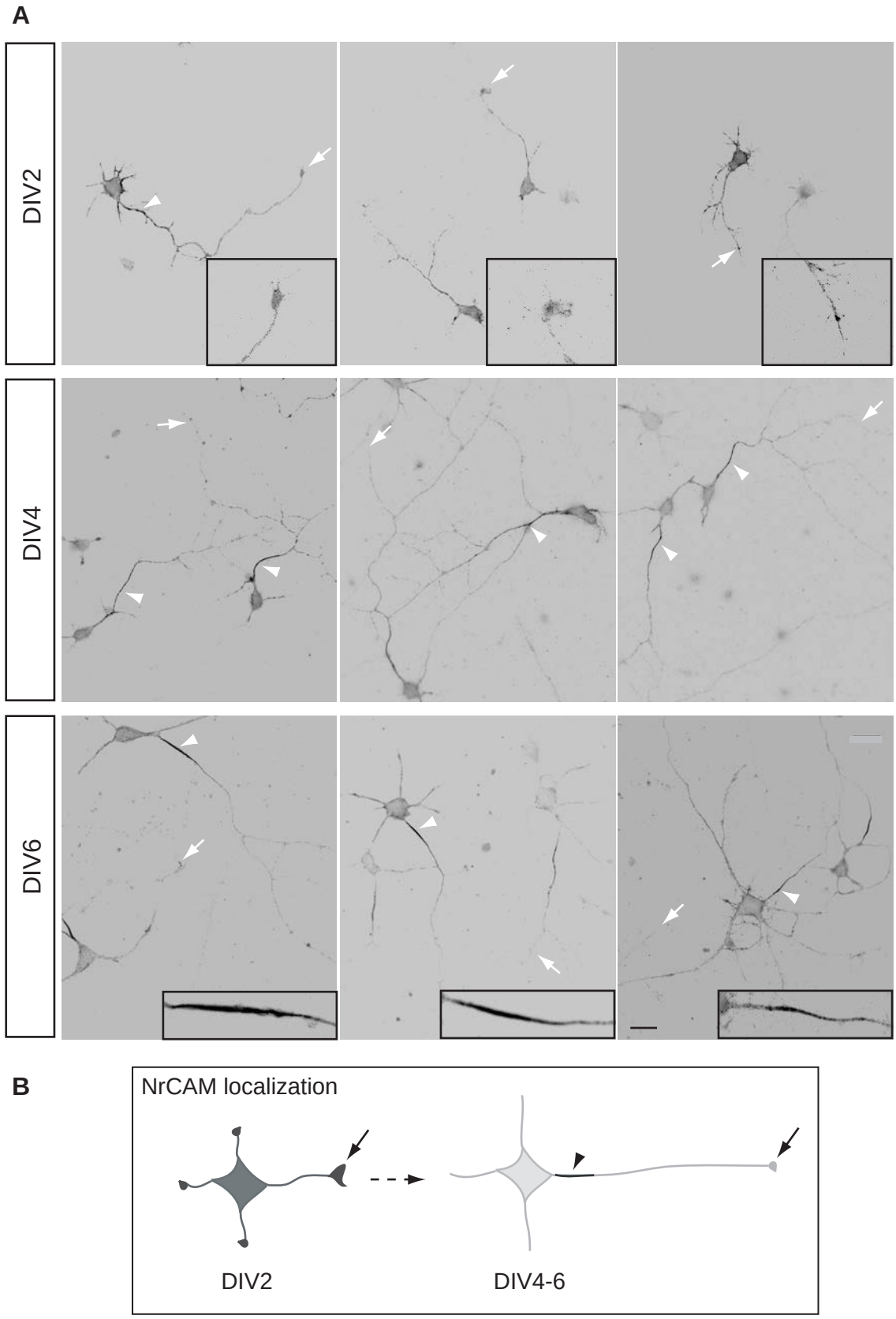
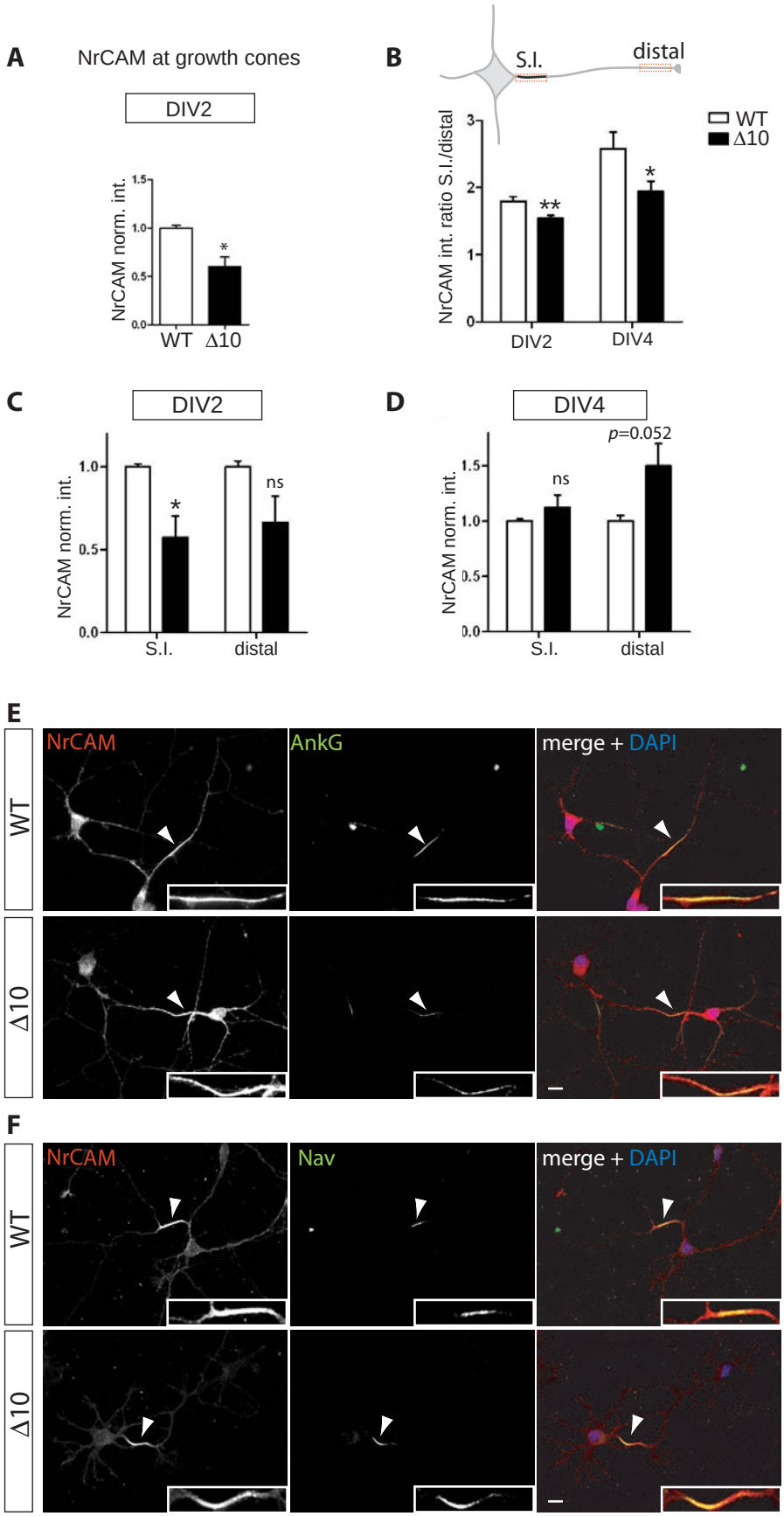


Figure 4 | Localisation de NrCAM et maturation neuronale, immunomarquages sur cellules vivantes. ***A*****,** Neurones dissociés de cortex piriforme à E14.5 immunomarqués avec un anticorps anti-NrCAM (dirigé contre la région extracellulaire de la protéine) à deux jours (DIV2), quatre jours (DIV4) et six jours (DIV6) en culture, avant fixation. Les flèches montrent la localisation de NrCAM aux cônes de croissance, agrandis dans les encadrés noirs en bas à droite de chaque image à DIV2. Les têtes de flèche montrent la localisation de NrCAM au segment initial de l'axone, agrandis dans les encadrés noirs en bas à droite de chaque image à DIV6. ***B****,* Schéma résumant la localisation de NrCAM au cours de la maturation axonale. Barre d'échelle, 20 µm.

Figure 5 | Formation du segment initial et rôle de SCHIP-1 dans la localisation de NrCAM. *A*, Quantification de l'intensité normalisée de NrCAM dans les cônes de croissance de neurones dissociés de cortex piriforme WT et *Schip1*Δ10 (Δ10) à deux jours en culture (DIV2). ***B***, Quantification de l'intensité de NrCAM au segment initial de l'axone (S.I.) divisée par l'intensité de NrCAM dans l'axone distal, mesurées comme représenté sur le schéma, à DIV2 et DIV4. ***C***, ***D***, Quantification de l'intensité normalisée de NrCAM au segment initial de l'axone et dans l'axone distal à DIV2 (*C*) et DIV4 (*D*). ***E***, ***F***, Immunomarquages de neurones de cortex piriforme WT et *Schip1*Δ10 (Δ10) à DIV4 avec des anticorps anti-NrCAM et anti-ankyrine G (AnkG) (*E*) ou anti-Na_v (*F*). Les têtes de flèche montrent l'enrichissement de NrCAM et de l'ankyrine G ou de Na_v au segment initial de l'axone, agrandi dans les encadrés blancs en bas à droite de chaque image. Analyses statistiques, Mann-Whitney, $p^*<0.05$, $^{**}p<0.01$. N=5 embryons/génotype. Barre d'échelle, 20 µm.


A
NrCAM at growth cones
DIV2
NrCAM norm. int.
1.5
1.0
0.5
0.0
*
WT
Δ10
B
S.I.
distal
WT
Δ10
NrCAM int. ratio S.I./distal
3
2
1
0
**
*
DIV2
DIV4
C
DIV2
NrCAM norm. int.
1.0
0.5
0.0
*
ns
S.I.
distal
D
DIV4
p=0.052
NrCAM norm. int.
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
S.I.
distal
E
WT
Δ10
NrCAM
AnkG
merge + DAPI
F
WT
Δ10
NrCAM
Nav
merge + DAPI

B. Autres défauts de fibres observés dans le cerveau des souris *Schip1*Δ10

Au cours du développement, *Schip1* est exprimé dans les structures dont les axones forment la commissure antérieure et le corps calleux, mais également dans l'hippocampe, le striatum et le thalamus (cf. Article). Cette observation nous a conduits à déterminer si les souris mutées *Schip1*Δ10 adultes présentaient des défauts plus subtiles des axones de ces structures grâce à immunomarquages avec des anticorps anti-neurofilaments (décrits dans l'article). Nous avons observé des anomalies d'organisation des fibres cortico-thalamiques, fasciculées en faisceaux plus gros et moins nombreux chez les souris mutées comparées aux souris sauvage (WT) (Figure 6, *A*, *B*), suggérant un rôle de SCHIP-1 dans la fasciculation des axones. L'organisation des fibres moussues du gyrus denté de l'hippocampe semblait également différente chez les souris mutées et les souris WT. Des immunomarquages avec des anticorps dirigés contre un marqueur nucléaire des neurones, NeuN (Millipore, clone A60, #MAB377), et contre le transporteur du zinc des terminaisons des fibres moussues (ZnT3) ont permis d'affiner nos observations (Figure 6, *C*). Les terminaisons des fibres moussues sont concentrées dans la région apicale de la couche CA3 dans l'hippocampe des souris mutées alors qu'elles envahissent cette couche dans l'hippocampe WT. De plus, les neurones de la couche CA3 semblent plus compacts dans l'hippocampe des souris mutées. Ces résultats ne permettent pas de conclure sur le fait que le défaut de projection des cellules du gyrus denté entraîne la réorganisation des cellules pyramidales de la couche CA3 de l'hippocampe, ou qu'inversement le défaut d'organisation de ces cellules soit à l'origine du défaut de projection des fibres moussues chez les souris mutées. Une hypothèse concernant les fibres moussues serait qu'elles présentent une trop forte fasciculation qui les empêcherait d'envahir la région CA3 de l'hile. Ceci soutiendrait une implication potentielle de SCHIP-1 dans les processus de fasciculation au cours du développement.

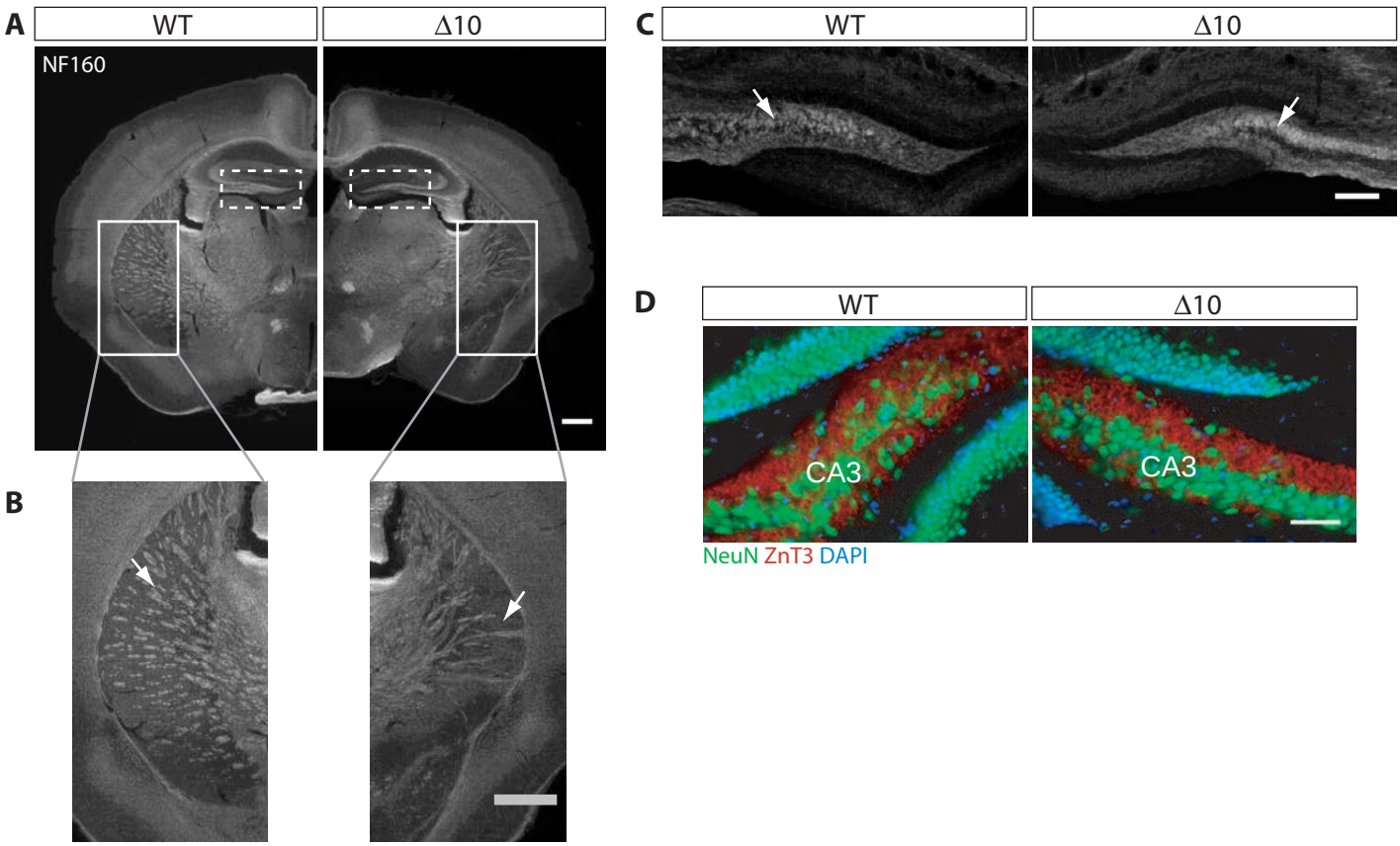


Figure 6 | Les souris *Schip1*Δ10 présentent des défauts des fibres cortico-thalamiques et des fibres moussues. ***A*-*C***, Coupes coronales de cerveaux adultes WT et *Schip*1Δ10 (Δ10) immunomarquées avec des anticorps anti-neurofilament (NF160). ***B***, Agrandissement de la région encadrée en *A*, montrant les fibres cortico-thalamiques, fasciculées en plus gros faisceaux moins nombreux chez les souris Δ10 (flèches). ***C***, Agrandissement de la région encadrée en pointillés en *A*, montrant l'hippocampe, où les fibres moussues du gyrus denté sont anormales chez les souris Δ10 (flèches). ***D***, Coupes coronales de cerveaux adultes, au niveau de l'hile de l'hippocampe, immunomarquées avec des anticorps anti-NeuN et anti-ZnT3, permettant de visualiser les corps des neurones et les terminaisons des fibres moussues respectivement, et co-marquées avec du DAPI. Les fibres moussues sont ségrégées au-dessus de la région CA3 de l'hile et les cellules de la couche CA3 sont compactées chez les souris Δ10. N=3 animaux/génotype. Barre d'échelle, 500 µm (*A*, *B*) ; 150 µm(*C*) ; 50 µm (*D*).

DISCUSSION

I. Rôle de SCHIP-1 dans la croissance et le guidage des axones

Les données *in vivo* et *in vitro* acquises au cours de ma thèse convergent vers un rôle de SCHIP-1 dans la croissance et le guidage des axones. Les souris mutées *Schip1*Δ10 présentent des défauts dans des faisceaux d'axones majeurs, comme la commissure antérieure (CA), le corps calleux, les fibres cortico-thalamiques et les fibres moussues du gyrus denté. Au niveau de la CA, la branche antérieure est plus fine et peu d'axones traversent la ligne médiane, la branche postérieure est quant à elle absente. Les axones de la branche antérieure de la CA semblent cependant suivre une route « correcte », comparable à celle des axones des souris sauvages (WT). Les rares axones émanant du cortex piriforme postérieur, qui devraient normalement former la branche postérieure de la CA, ne projettent pas vers la ligne médiane et restent proches du cortex piriforme ipsilatéral. Ceci suggère des anomalies de guidage, en plus des défauts de croissance axonale. Les observations *in vitro* sont cohérentes avec le phénotype observé au niveau de la CA chez les souris mutées : les axones des régions antérieure et postérieur du cortex piriforme présentent un retard de croissance ; par contre, seuls les axones d'explants de cortex piriforme postérieur présentent une réponse de répulsion anormale en présence d'explants de striatum latéral. Cette observation suggère que la mutation *Schip1*Δ10 confère au cortex piriforme postérieur une sensibilité trop forte à des molécules de guidage répulsives exprimées par le striatum latéral, structure bordant le cortex piriforme et à travers laquelle les axones de la CA poussent pour atteindre la ligne médiane. Nous avons plus spécifiquement montré que SCHIP-1 participe à la réponse des cônes de croissance à l'EphB2 et la sémaphorine 3F (Séma3F), deux molécules de guidage répulsives nécessaires au développement de la CA (Henkemeyer et al., 1996; Sahay et al., 2003).

Comment SCHIP-1 pourrait-elle participer au développement des axones de la CA ?

Les complexes protéiques présents aux cônes de croissance et au segment initial ou aux nœuds de Ranvier sont similaires dans leur composition. Ils comprennent des canaux/récepteurs spécifiques et des protéines d'adhésion de la famille L1-CAM, qui interagissent avec le cytosquelette cortical de la cellule, composé notamment d'ankyrines et de spectrines permettant leur ancrage au cytosquelette d'actine (Figure 1).

Le laboratoire a montré qu'une isoforme de SCHIP-1, IQCJ-SCHIP-1, est concentrée au segment initial de l'axone et aux nœuds de Ranvier, où elle interagit avec l'ankyrine G et la spectrine βIV (Martin et al., 2008 ; Article annexe 1). Des expériences de RT-PCR ont révélé qu'au stade embryonnaire E14.5, le cortex piriforme et les neurones de cortex piriforme à deux jours en culture expriment les isoformes SCHIP-1b, SCHIP-1c et IQCJs-SCHIP-1, mais pas l'isoforme IQCJ-SCHIP-1. SCHIP-1b, SCHIP-1c et IQCJs-SCHIP-1 sont localisées le long de l'axone et aux cônes de croissance des neurones de cortex piriforme en culture. Les isoformes de SCHIP-1 semblent

donc présenter une expression différentielle au cours du développement. Cependant, toutes les isoformes de SCHIP-1 partagent une région C-terminale commune, comprenant le motif *leucine zipper* d'interaction avec les ankyrines G et B, et la spectrine βIV. Alors que l'ankyrine G est localisée au segment initial et aux nœuds de Ranvier de l'axone mature, l'ankyrine B est exprimée de manière plus précoce dans l'axone distal et au cône de croissance des neurones (Yoshimura and Rasband, 2014). De fait, les isoformes SCHIP-1b, SCHIP-1c et IQCJs-SCHIP-1 pourraient interagir avec l'ankyrine B au cours du développement axonal. Compte-tenu de l'importance des complexes ankyrine/spectrine dans l'organisation du cytosquelette cortical des cellules, il est probable que l'ankyrine B soit associée avec des spectrines. Les spectrines βII et αII ont été décrites dans l'axone distal des neurones en développement (Yoshimura and Rasband, 2014). SCHIP-1 pourrait donc également être associée avec ces spectrines, bien que l'interaction reste à être démontrée. Chez les souris *Schip1*Δ10, le taux d'ARNm correspondant aux isoformes tronquées potentielles est très faible dans le cortex piriforme en développement. L'expression et la stabilité des protéines tronquées n'ont pas été démontrées. Ces protéines, si elles existent, n'ont plus la capacité d'oligomériser ou d'interagir avec l'ankyrine et la spectrine.

L'ankyrine B a été impliquée dans la croissance et/ou le guidage des axones. Les souris invalidées pour l'expression de l'ankyrine B présentent des anomalies sévères de faisceaux de fibres, décrites particulièrement au niveau du corps calleux, de la capsule interne et de la fimbria (Scotland et al., 1998). L'ankyrine B participe à l'initiation et la croissance neuritique dépendantes de L1CAM (Gil et al., 2003; Nishimura et al., 2003a). Les spectrines ont également été impliquées dans des mécanismes de croissance et de guidage des axones (Hulsmeier et al., 2007). Plus spécifiquement, il a été montré que la spectrine αII joue un rôle dans la croissance neuritique et dans la localisation de L1CAM à la membrane des cônes de croissance (Trinh-Trang-Tan et al., 2014). La fonction de SCHIP-1 dans la croissance et le guidage des axones pourrait donc reposer sur sa participation aux complexes moléculaires comprenant l'ankyrine B et les spectrines αII/βII, qui permettent d'assurer le couplage entre les protéines d'adhésion de la famille L1-CAM et le cytosquelette d'actine aux cônes de croissance (Figure 1).

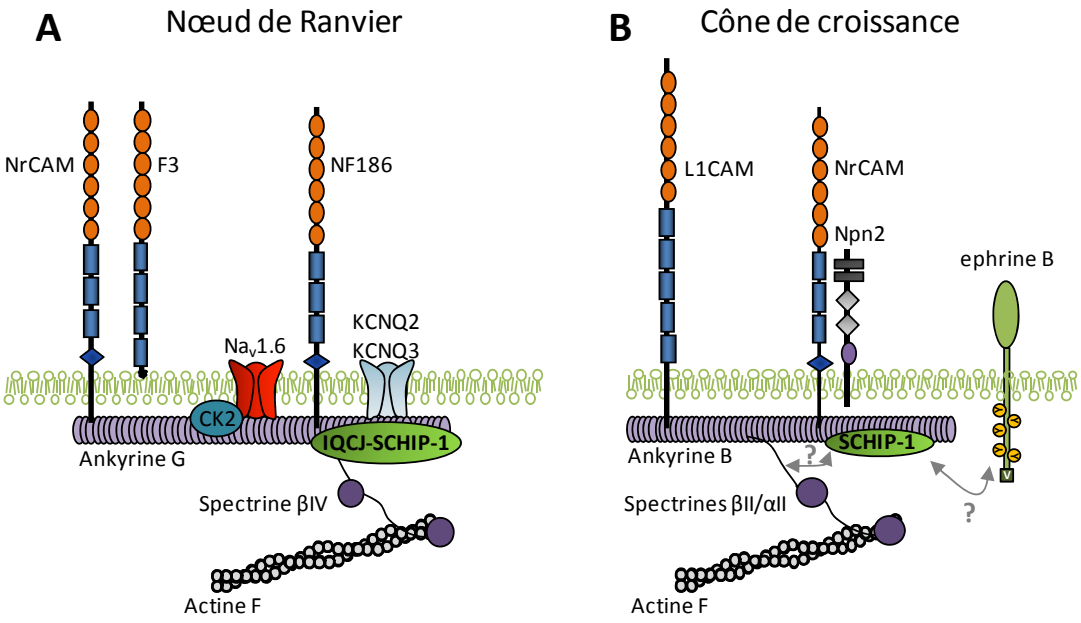


Figure 1 | Implication de SCHIP-1 dans les complexes protéiques au nœud de Ranvier et au cône de croissance. ***A***, Au nœud de Ranvier, l'isoforme IQCJ-SCHIP-1 interagit avec l'ankyrine G et la spectrine βIV qui ancrent les protéines transmembranaires au cytosquelette d'actine. ***B***, Au cône de croissance, SCHIP-1b, SCHIP-1c et IQCJs-SCHIP-1 pourraient interagir avec l'ankyrine B qui ancre les molécules de la famille L1-CAM au cytosquelette d'actine, et avec les spectrines βII ou αII. Le récepteur de guidage axonal neuropiline 2 (Npn2) interagit avec NrCAM. L'association de l'ephrine B dans de tels complexes est inconnue à ce jour.

Comme je l'ai précédemment décrit dans l'introduction, la localisation polarisée des protéines d'adhésion au cône de croissance est nécessaire à sa migration : ces protéines, présentes au front de migration du cône, suivent un mouvement rétrograde vers la région centrale du cône où elles sont endocytées, puis recyclées et ré-insérées à la membrane au front de migration (Itofusa and Kamiguchi, 2011). Cette dynamique génère des forces de traction d'une part, et renouvelle les adhésions au substrat d'autre part, ce qui permet au cône de croissance de naviguer dans son environnement. La régulation de l'interaction entre L1CAM et l'ankyrine B est essentielle à la localisation dynamique de L1CAM à la membrane plasmique (Gil et al., 2003; Nishimura et al., 2003a). Lorsque L1CAM interagit avec l'ankyrine B, elle est stabilisée à la membrane, ce qui génère des forces de traction permettant la formation d'une protrusion et l'initiation neuritique (Nishimura et al., 2003a). Lorsque l'interaction de L1CAM avec l'ankyrine B est inhibée par la phosphorylation du domaine intracellulaire de L1CAM, cette dernière est plus mobile à la membrane et peut être endocytée, ce qui stimule la croissance neuritique (Gil et al., 2003). Il a en outre été décrit que le couplage de NrCAM avec le flux rétrograde d'actine dépendait d'interactions faisant intervenir son domaine cytoplasmique, de la formation de complexes en *cis* grâce aux domaines extracellulaires FNIII et de son aggrégation dans des *rafts* lipidiques (Falk et al., 2004). Les protéines de la famille L1-CAM présentent un domaine conservé

d'interaction à l'ankyrine B (Herron et al., 2009). Les mécanismes de régulation décrits pour L1CAM pourraient donc être communs aux autres protéines L1-CAM. Grâce à son interaction avec l'ankyrine B, SCHIP-1 pourrait participer à la régulation de l'interaction entre une protéine de la famille L1-CAM et l'ankyrine B. SCHIP-1 pourrait favoriser cette interaction et donc stimuler la génération de forces de traction au cône de croissance nécessaires pour l'initiation neuritique. Au contraire, SCHIP-1 pourrait déstabiliser cette interaction, ce qui favoriserait l'endocytose de la protéine L1-CAM, diminuerait l'adhésion du cône à son substrat et faciliterait la croissance axonale. Des expériences supplémentaires de cultures neuronales sur un substrat composé de la protéine L1-CAM étudiée, pourraient permettre d'investiguer ces hypothèses.

Cependant, la protéine L1-CAM à laquelle SCHIP-1 pourrait être associée n'est pas connue. Les protéines L1CAM et NrCAM sont exprimées par les axones de la CA mais aucune anomalie de la CA n'a été décrite chez les souris invalidées pour l'expression de L1CAM et les souris invalidées pour l'expression de NrCAM ne présentent que des anomalies subtiles de guidage et de fasciculation de ces axones (Falk et al., 2005). Il a été décrit que L1CAM et NrCAM ont des fonctions redondantes dans le développement des cellules granulaires du cervelet où elles sont toutes les deux exprimées (Sakurai et al., 2001). Ces mécanismes de redondances fonctionnelles pourraient également avoir lieu au niveau des axones de la CA, et ne nous permettent pas de conclure sur l'importance respective de chacune de ces protéines dans le développement de ces axones. Par contre, la diminution de l'intensité de NrCAM que nous avons observée aux cônes de croissance de neurones mutés *Schip1*Δ10 serait en faveur d'une association de SCHIP-1 avec la protéine NrCAM (Résultats supplémentaires, Figure 5).

Nous avons montré que les neurones dissociés de cortex piriforme d'embryons mutés *Schip1*Δ10 en culture présentaient un retard d'initiation et de croissance axonales (cf. Article). Comment interpréter ces résultats dans le cadre de l'hypothèse d'une association de SCHIP-1 avec la protéine NrCAM ? Les expériences de cultures neuronales que nous avons développées ont été réalisées sur un substrat de poly-L-lysine et laminine. De manière intéressante, il a été montré que la croissance axonale stimulée par l'interaction de la fibronectine, une protéine de la matrice extracellulaire, avec l'intégrine β1 était augmentée par l'interaction de la contactine/F11 avec NrCAM (Treubert and Brummendorf, 1998). Les auteurs proposent un modèle où la croissance axonale dépendante de l'intégrine β1 ferait intervenir la voie de signalisation en aval de NrCAM. La laminine est une autre protéine de la matrice extracellulaire qui interagit avec les intégrines. Dans le contexte de nos expériences de culture, il est donc envisageable que NrCAM puisse participer à la croissance axonale stimulée par la laminine. SCHIP-1 pourrait alors participer à la localisation et/ou à la stabilisation de NrCAM à la membrane *via* le complexe NrCAM/ankyrine B/actine F. Lorsque SCHIP-1 est absente, l'interaction entre NrCAM et l'ankyrine B pourrait être déstabilisée, ce qui conduirait à l'endocytose de NrCAM. La diminution de NrCAM à la membrane pourrait affecter la croissance axonale stimulée par l'interaction de la laminine aux intégrines.

Nos données suggèrent que SCHIP-1 pourrait participer à la localisation de NrCAM de manière plus générale. Au cours de la maturation axonale, NrCAM est progressivement éliminée de l'axone distal et concentrée au segment initial dans les neurones WT (Résultats supplémentaires, Figure 3, 4). Nous avons montré que l'élimination de NrCAM de l'axone distal au cours de la maturation semblait affectée dans les neurones mutés *Schip1*Δ10 (Résultats supplémentaires, Figure 5). Nous ne pouvons cependant pas conclure sur le fait que SCHIP-1 participe directement à l'enrichissement de NrCAM au segment initial de l'axone car les défauts observés pourraient être une conséquence du retard de l'élongation et donc de la maturation axonale des neurones mutés.

L'implication de SCHIP-1 dans un complexe moléculaire comprenant la protéine NrCAM pourrait également permettre d'expliquer l'implication de SCHIP-1 dans la réponse à la Séma3F (Résultats supplémentaires, Figure 2). L'interaction de NrCAM avec la neuropiline 2 a en effet été montrée nécessaire à la réponse des axones de la CA à la Séma3F (Falk et al., 2005). Nous avons observé que l'incubation des neurones en culture avec la Séma3F induit une réponse de collapse des cônes plus rapide dans les cultures de neurones mutés *Schip1*Δ10 que dans les cultures WT (Résultats supplémentaires, Figure 2). Il a été montré que l'interaction de la neuropiline 1 avec les molécules d'adhésion co-récepteurs L1CAM et TAG-1 permettait son endocytose en réponse à la Séma3A (Castellani et al., 2000; Castellani et al., 2004). L'endocytose de L1CAM en réponse à la Séma3A serait notamment régulée par les protéines ERMs (Mintz et al., 2008). Dans les vésicules d'endocytose, L1CAM co-localise avec la kinase de signalisation ERK, ce qui permet l'activation de la voie MAPK impliquée dans la réponse à la Séma3A (Campbell and Holt, 2003; Schaefer et al., 1999; Schmid et al., 2000). Dans le contexte de nos expériences, ces données suggèrent que l'absence de SCHIP-1 pourrait faciliter l'endocytose du complexe NrCAM/neuropiline 2 et donc accélérer la réponse à la Séma3F. Cette fonction pourrait faire intervenir l'interaction de SCHIP-1 avec l'ankyrine. Cependant, SCHIP-1 a initialement été identifiée comme un partenaire de la merline, une protéine de la superfamille 4.1 présentant de fortes homologies avec les protéines ERMs (Goutebroze et al., 2000). L'interaction de SCHIP-1 avec les protéines ERMs n'a pas été démontrée à ce jour, mais son interaction avec la merline suggère que SCHIP-1 pourrait participer aux complexes sous-membranaires comprenant ces protéines à domaines FERM. L'interaction potentielle de SCHIP-1 avec les protéines ERMs pourrait donc également participer à la régulation de la localisation des protéines de la famille L1-CAM à la membrane et à la réponse aux molécules de guidage.

La réponse observée lors de l'incubation des neurones avec la molécule de guidage EphB2 semble différente et il n'existe aucune indication qu'il puisse y avoir un lien entre l'ephrine B et les protéines L1CAM et/ou l'ankyrine (Figure 1). Il a été montré que le rôle de l'EphB2 dans le développement de la CA repose sur son interaction avec l'ephrine B2 exprimée par les axones de

la CA (Cowan et al., 2004). Lorsque l'ephrine B est activée par son interaction avec l'EphB2, elle est phosphorylée et interagit avec plusieurs partenaires permettant l'activation de voies de signalisation qui aboutissent à des réorganisations du cytosquelette d'actine et à la collapse du cône de croissance (Xu and Henkemeyer, 2012). Nous avons observé qu'après 10 minutes d'incubation avec l'EphB2, les cônes de croissance présentent une forte réponse de collapse dans les cultures WT et mutées *Schip1*Δ10. Par contre, après 30 minutes d'incubation, alors que les cônes de croissance de neurones WT développent à nouveau des protrusions, les cônes de croissance de neurones mutés restent collapsés (Article, Figure 8). Ceci montre que la réponse de collapse en elle-même n'est pas altérée par la mutation *Schip1*Δ10. De fait, SCHIP-1 ne participe probablement pas directement à l'activation ou à la voie de signalisation de l'ephrine B. Par contre, dans ce contexte, SCHIP-1 semble impliquée dans les mécanismes d'adaptation des cônes de croissance à l'EphB2.

Nos résultats fournissent des indications sur le rôle potentiel de SCHIP-1 dans les mécanismes d'adaptation des cônes à l'EphB2. Nous avons observé que la quantité d'agrégats d'EphB2 fixés à la membrane des cônes collapsés diminue au cours de l'incubation dans les cultures WT, alors qu'elle reste stable dans les cultures de neurones mutés. Ceci suggère que SCHIP-1 pourrait participer à l'adaptation des cônes de croissance à l'EphB2 en régulant la quantité d'ephrines B à la membrane. En absence de SCHIP-1, l'ephrine B pourrait être « bloquée » à la membrane. Les résultats décrits précédemment soutiennent l'hypothèse d'un rôle de SCHIP-1 dans la stabilisation des protéines à la membrane et/ou dans leur endocytose. Nous ne pouvons cependant pas exclure que SCHIP-1 puisse également participer au trafic vésiculaire et/ou au recyclage de l'ephrine B, conduisant à une ré-insertion plus rapide de l'ephrine B après son endocytose dans les neurones mutés.

Comment expliquer que SCHIP-1 puisse participer à l'adaptation des cônes à l'EphB2 en régulant l'endocytose de l'ephrine B sans pour autant être impliquée dans la réponse de collapse *per se* ? Les données de la littérature n'apportent pas de réponses claires sur les mécanismes d'endocytose impliqués dans la collapse en réponse à l'EphB2. En effet, les expériences publiées qui étudient l'implication de l'endocytose dans les réponses de collapse reposent sur l'incubation de neurones en culture avec des inhibiteurs d'endocytose, comme le PAO (pour *phenylarsin oxide*), un inhibiteur des phosphatases phosphotyrosines qui bloque l'endocytose dépendante des récepteurs. L'activité inhibitrice des phosphatases du PAO peut avoir d'autres conséquences dans la cellule, comme une inhibition de la consommation d'oxygène par les cellules et une diminution du contenu cellulaire en ATP (Gibson et al., 1989). Cet inhibiteur n'est donc pas spécifique de l'endocytose d'un récepteur donné et peut avoir des effets secondaires délétères. De fait, il est difficile de déterminer sur un plan technique si l'endocytose est une réponse secondaire à l'activation de la voie de signalisation dépendante du récepteur facilitant les changements morphologiques du cône lors de la collapse, ou si l'endocytose du récepteur est

nécessaire à la voie de signalisation et donc à la réponse de collapse. Cependant, dans le cas de l'EphB, des études suggèrent que l'activation de la voie de signalisation en aval de l'ephrine B ne nécessiterait pas l'endocytose du complexe EphB/ephrine B (Xu and Henkemeyer, 2012). De plus, des expériences de culture de neurones avec des cellules exprimant EphB2 ont montré que la trans-endocytose du complexe EphB/ephrine B avait lieu après la réponse de collapse des cônes et semblait surtout importante pour le détachement des deux cellules et la rétraction de l'axone (Zimmer et al., 2003). Dans le cadre de nos expériences, SCHIP-1 pourrait intervenir dans l'internalisation de l'ephrine B secondaire à la réponse de collapse, et permettre l'adaptation des cônes à l'EphB2 présent dans le milieu de culture. L'ephrine B possède divers domaines d'interaction protéiques dans sa région intracellulaire. Il serait donc intéressant de déterminer si SCHIP-1 pourrait faire partie de complexes protéiques associés à l'ephrine B.

Comment expliquer que la mutation *Schip1*Δ10 altère de manière différente la réponse à la Séma3F et la réponse à l'EphB2 ? Il est tout d'abord important de noter que les axones des neurones WT eux-mêmes ne répondent pas de la même manière à ces deux molécules de guidage répulsives dans les conditions de culture que nous avons développées. En effet, la proportion de cônes collapsés augmente beaucoup plus vite en présence d'EphB2 qu'en présence de la Séma3F. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les voies de signalisation impliquant la neuropiline 2 et NrCAM ou impliquant les ephrines B sont différentes bien qu'aboutissant toutes deux à la collapse du cône, et pourraient de fait présenter des dynamiques spécifiques. La réponse à la Séma3F pourrait reposer sur l'endocytose du complexe NrCAM/neuropiline 2 nécessaire à l'activation de la voie de signalisation, alors que pour l'ephrine B, son domaine intracellulaire permet l'interaction directe avec de nombreuses protéines, et l'activation de voies de signalisation conduisant à la réponse de collapse (Xu and Henkemeyer, 2012). Selon le contexte cellulaire et les molécules considérées, l'implication de l'endocytose dans la réponse de collapse semble donc varier, ce qui pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas observé les mêmes altérations des réponses à la Séma3F et à l'EphB2 chez les neurones *Schip1*Δ10. Nos expériences ne nous ont pas permis d'appréhender l'implication de SCHIP-1 dans l'adaptation des cônes à la Séma3F, il serait donc intéressant de réaliser des expériences de collapse supplémentaires avec des temps d'incubation plus longs.

De nombreuses autres molécules de guidage ont été impliquées dans le développement de la CA (Lindwall et al., 2007). L'expression de ces molécules ne se restreint pas au striatum, mais est retrouvée tout autour de la « route » empruntée par les axones de la CA. SCHIP-1 pourrait-elle participer de manière générale à des mécanismes de guidage, qui impacteraient la réponse à diverses molécules ? Parmi les molécules importantes pour le développement de la CA, la nétrine-1 est connue pour son rôle attractif à la ligne médiane. Compte tenu des défauts observés au niveau de la CA chez les souris mutées *Schip1*Δ10, un défaut d'attraction des axones par des molécules exprimées à la ligne médiane est envisageable et il serait intéressant de savoir

si SCHIP-1 pourrait participer à ces processus. Par ailleurs, les molécules de guidage décrites dans le cadre du développement de la CA sont le plus souvent également impliquées dans le développement d'autres faisceaux d'axones (cf. Introduction Tableau 2, p. 79). L'implication de SCHIP-1 dans les réponses aux molécules de guidage pourrait potentiellement conduire aux autres défauts que nous avons observés au niveau du corps calleux, des fibres cortico-thalamiques et des fibres moussues de l'hippocampe chez les souris mutées *Schip1*Δ10.

II. Développement et organisation du cortex piriforme

Nous avons montré qu'à partir du stade embryonnaire E16.5, le cortex piriforme des embryons mutés *Schip1*Δ10 présentait une diminution d'épaisseur dans les régions caudales du cerveau. A la naissance, la couche 2 est plus fine dans tout le cortex piriforme, la couche 3 n'étant affectée que dans les régions caudales. Cette diminution d'épaisseur ne semble pas être la cause de graves défauts de génération ou de migration des neurones du cortex piriforme mais semble plutôt reposer sur une augmentation de la mort cellulaire, visible à E14.5, stade embryonnaire auquel les axones de la CA poussent activement. Cependant, l'absence de SCHIP-1 n'induit pas d'augmentation de la mort cellulaire en culture. Ces résultats suggèrent que l'absence de SCHIP-1 *per se* ne déclenche pas la mort cellulaire, mais que des facteurs extrinsèques conduiraient à la mort des neurones du cortex piriforme chez les souris mutées. Les neurones mutés pourraient par exemple être plus sensibles que les neurones WT à des signaux pro-apoptotiques exprimés par les tissus voisins. De manière intéressante, des molécules répulsives de guidage axonal de la famille des ephrines et des sémaphorines ont été impliquées dans la mort neuronale (Park et al., 2013; Vanderhaeghen and Cheng, 2010). Nous avons montré que les cônes de croissance de neurones mutés présentaient des défauts d'adaptation à la molécule répulsive EphB2 *in vitro*. *In vivo*, ces défauts d'adaptation pourraient conduire à la mort des cellules. Par ailleurs, les axones mutés ne se développant pas normalement, les neurones du cortex piriforme n'ont peut-être pas accès à des signaux anti-apoptotiques, comme les facteurs neurotrophiques, exprimés à la ligne médiane par exemple. Dans le SNP, il a été montré que les facteurs neurotrophiques sécrétés par les cellules-cibles sont assimilés au niveau de l'axone, et importants pour la survie des neurones de projection (Huang and Reichardt, 2001). Ce type de mécanisme est peu décrit dans le SNC, mais il a été montré que la formation de l'axone est importante pour la survie des neurones dans le cortex (Barnes et al., 2007).

Afin de mieux caractériser et comprendre les défauts observés au niveau du cortex piriforme, il serait intéressant de pouvoir identifier si les cellules qui meurent au cours du développement appartiennent à une population cellulaire particulière et si elles correspondent aux neurones dont les axones devaient former la CA. Deux populations de cellules pyramidales ont été décrites

dans la couche 2 du cortex piriforme, les cellules semilunaires et superficielles. Ces cellules ont été identifiées grâce à leurs propriétés morphologiques et physiologiques (Suzuki and Bekkers, 2006, 2011), mais aucun marqueur moléculaire spécifique de chaque type cellulaire n'existe actuellement. Des études combinées de traçage et d'électrophysiologie pourraient permettre d'étudier plus spécifiquement les neurones dont les axones forment la CA. En ce sens, j'ai initié des injections d'un traceur lipophilique (DiI) au niveau de la branche postérieure de la CA dans des cerveaux de souris WT coupés le long de la ligne médiane. Ce traceur a permis de marquer des neurones dans la couche 2 du cortex piriforme, ce qui est cohérent avec le fait que cette couche présente une forte densité en neurones de projection. Les dendrites apicales des neurones marqués sont visibles dans la couche 1 du cortex piriforme, suggérant que ces neurones ont des contacts synaptiques avec les axones du tractus olfactif latéral et qu'ils sont potentiellement activés par une stimulation du bulbe olfactif. Des études complémentaires pourraient indiquer si les neurones marqués ont des propriétés physiologiques spécifiques et s'ils appartiennent à l'une des deux populations de cellules pyramidales décrites précédemment.

La compréhension de certains des défauts observés chez les souris *Schip1*Δ10 pourrait également provenir d'une analyse comparative avec les nombreux autres modèles de souris présentant des anomalies de CA. Cependant, la majorité des études publiées à ce jour concernant ces souris ne s'intéressent pas à l'organisation du cortex piriforme, ou des autres structures dont les axones forment la CA, comme le noyau olfactif antérieur ou l'amygdale. Une seule étude montre que les souris invalidées pour l'expression du récepteur tyrosine kinase au facteur de croissance des fibroblastes Fgfr3 présentent une diminution de l'épaisseur du cortex piriforme. (Moldrich et al., 2011). Cependant, les défauts observés au niveau de la CA chez ces souris sont subtils, les deux branches étant faiblement réduites. Par ailleurs, contrairement à ce que nous avons observé pour les souris *Schip1*Δ10, la diminution d'épaisseur du cortex piriforme est associée à une augmentation de la densité cellulaire, et non pas de la mort cellulaire. Il paraît donc difficile de comparer les souris *Schip1*Δ10 aux souris mutées pour Fgfr3.

Bien qu'il soit logique de penser que les neurones qui meurent sont ceux dont les axones devraient former la CA chez les souris mutées *Schip1*Δ10 dans le contexte de notre étude, nous ne pouvons pas exclure que ces cellules puissent également être des neurones de projection ipsilatérale. Les données *in vitro* suggèrent que la croissance axonale est affectée dans tous les neurones du cortex piriforme chez les embryons mutés. De fait, les projections ipsilatérales du cortex piriforme pourraient également être altérées chez les souris *Schip1*Δ10. Des injections de virus induisant l'expression de la GFP par les axones permettraient de visualiser plus finement ces projections vers le thalamus, l'hypothalamus, l'amygdale et le cortex entorhinal, et de déterminer si elles sont affectées chez les souris mutées. Ces informations seraient importantes pour comprendre les anomalies fonctionnelles potentielles du cortex piriforme.

III. Fonction de la commissure antérieure, du cortex piriforme et olfaction

Les souris *Schip1*Δ10 ne présentent apparemment pas de défaut primordial de perception olfactive, suggérant que l'organisation et la fonction du bulbe olfactif ne sont pas affectées. Le tractus olfactif latéral formé par les axones des cellules mitrales et touffues du bulbe olfactif semble également normal chez ces souris. Il est par contre probable que les défauts de connexion observés au niveau de la CA et l'absence d'une population cellulaire dans le cortex piriforme des souris *Schip1*Δ10 conduisent à des défauts d'activité du réseau neuronal, qui pourraient potentiellement expliquer certains de leurs comportements anormaux.

Nous avons montré que les souris mutées *Schip1*Δ10 présentent un intérêt diminué à une odeur « sociale ». D'autres défauts de comportement ont pu être remarqués chez ces souris et pourraient être liés, du moins en partie, à des défauts d'intégration de l'information odorante dans le cortex piriforme. Les souris femelles homozygotes pour la mutation *Schip1*Δ10 sont rarement gestantes et présentent un comportement maternel anormal. Leur nid est moins bien construit que le nid des femelles WT. Ces femelles prennent également beaucoup plus de temps que les femelles WT pour regrouper leurs petits éparpillés volontairement dans la cage par un expérimentateur. Par ailleurs, une forte proportion de nouveau-nés mutés ne présente pas de lait dans l'estomac comparée aux nouveau-nés WT ou hétérozygotes, ceci soulignant une difficulté à s'alimenter qui pourrait notamment expliquer pourquoi la proportion de souris mutées est plus faible au sevrage.

Afin de savoir si les neurones du cortex piriforme répondent normalement à une stimulation odorante chez les souris *Schip1*Δ10, des expériences de présentation d'odeurs et d'enregistrements dans le cortex piriforme sur souris anesthésiées pourraient être réalisées. Afin d'investiguer plus en détail les réponses des cellules des couches 2 et 3 du cortex piriforme à une stimulation par les axones du tractus latéral olfactif, des expériences d'enregistrement de l'activité de ces cellules pourraient être réalisées en tranches en stimulant directement le tractus olfactif latéral. De plus, il serait intéressant de comparer les enregistrements dans les régions antérieure et postérieure du cortex piriforme. Nous avons en effet montré que le cortex piriforme postérieur était plus sévèrement affecté que le cortex piriforme antérieur chez les souris mutées *Schip1*Δ10. Comme je l'ai indiqué dans l'introduction, les régions antérieure et postérieure du cortex piriforme sont connues pour avoir des fonctions différentielles dans l'intégration des odeurs. Le cortex piriforme antérieur aurait un rôle dans le codage de l'identité structurale de l'odeur, alors que le cortex piriforme postérieur serait impliqué dans le codage de la catégorie perceptuelle de l'odeur (Gottfried, 2010). Les souris mutées *Schip1*Δ10 pourraient

de fait être un modèle utile pour mieux appréhender les différences de fonctions des régions antérieure et postérieure du cortex piriforme.

La fonction de la CA dans les processus de traitement et d'intégration de l'information odorante reste une question ouverte. L'absence de la branche postérieure de la CA a récemment été impliquée dans des anomalies de comportement telles que des anomalies d'interactions sociales et des anomalies de préférence de nourriture chez les souris présentant une haploinsuffisance pour le facteur de transcription Tbr1 (Huang et al., 2014). Les auteurs proposent que ces anomalies de comportement reposent sur l'absence de projections contralatérales de l'amygdale. Cependant, la branche postérieure de la CA est également et fortement constituée d'axones du cortex piriforme postérieur, structure non décrite dans cette étude. Les comportements observés chez ces souris pourraient donc également reposer sur des défauts d'association et d'apprentissage des odeurs au sein du cortex piriforme, suggérant un rôle important de la CA dans ces processus.

IV. Défauts de substance blanche et pathologies

Un certain nombre de données suggèrent à ce jour que le gène *SCHIP1* pourrait être un gène de susceptibilité pour les maladies du spectre de l'autisme. Le spectre de l'autisme recouvre différentes maladies neuro-développementales hétérogènes sur le plan clinique, qui affectent 0.6% des enfants. Il se traduit chez les patients par des troubles de la communication et des interactions sociales, et des comportements restreints et/ou répétitifs (DiCicco-Bloom et al., 2006).

Chez l'Homme, le gène *SCHIP1* est localisé dans une région chromosomique qui a été associée aux maladies du spectre de l'autisme (3q25), mais dans laquelle les gènes responsables n'ont pas encore été identifiés (Auranen et al., 2003; Goutebroze et al., 2001). Cependant, une inversion chromosomique proche du gène *SCHIP1* (3q25-29) a été décrite dans une famille présentant des troubles du langage (Kwasnicka-Crawford et al., 2006). Cette inversion est associée à une diminution de deux fois du taux d'expression de l'ARNm de *SCHIP1* dans les lymphoblastes du patient. Une autre étude a montré une surexpression de l'ARNm de *SCHIP1* dans les lymphoblastes de patients autistes (Hu et al., 2006). Des travaux récents du laboratoire ont par ailleurs montré que les souris mutées *Schip1*Δ10 présentent, outre les anomalies d'olfaction, de nombreuses autres anomalies de comportement retrouvées pour certaines chez les souris modèles des maladies du spectre de l'autisme (manuscrit en préparation). Les souris *Schip1*Δ10 présentent notamment des mouvements stéréotypés (sauts répétés dans un coin de la cage), une

diminution de l'anxiété par rapport aux souris WT, des anomalies d'interaction sociales et des défauts d'inhibition du réflexe de sursaut (*prepulse inhibition*).

L'une des problématiques majeures dans l'étude des maladies neuro-développementales aujourd'hui réside dans la difficulté d'établir un lien de causalité entre les anomalies morphologiques observées au niveau du cerveau et la pathologie chez l'Homme, ou les comportements chez les modèles murins. Dans le cas des souris *Schip1*Δ10, il est probable que les anomalies comportementales reposent sur l'altération de diverses fonctions cognitives. Il est cependant difficile d'établir un lien strict entre les nombreux défauts de faisceaux de fibres (commissure antérieure, corps calleux, fibres cortico-thalamiques, fibres moussues de l'hippocampe) et les anomalies de comportement. Seule la génération de souris mutées de manière conditionnelle chez qui SCHIP-1 serait absente uniquement dans une structure, pourrait permettre d'investiguer formellement ce point.

Néanmoins, des données de la littérature suggèrent fortement que des anomalies de fibres puissent être au moins en partie responsables de certaines anomalies de comportement. Les études génétiques ont conduit à considérer l'autisme comme une pathologie multifactorielle impliquant de nombreux gènes. De nombreuses données de la littérature sont en faveur du fait que des anomalies au niveau des synapses, et plus particulièrement des déséquilibres entre les synapses excitatrices et inhibitrices, pourraient être impliquées dans la physiopathologie de l'autisme (Ebert and Greenberg, 2013). Cependant, d'autres données soutiennent aussi l'hypothèse d'un disfonctionnement des réseaux neuronaux, et donc d'un défaut de traitement de l'information chez les patients autistes. Des études d'imagerie chez l'homme ont rapporté la présence d'anomalies de substance blanche chez les patients, notamment au niveau du corps calleux qui est souvent réduit (Dennis and Thompson, 2013). De plus, de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans des processus plus précoces de migration et polarisation neuronale, mais aussi de croissance et de guidage des axones ont été retrouvés comme étant des gènes de susceptibilité pour les maladies du spectre de l'autisme (McFadden and Minshew, 2013) (Figure 2). Dans leur revue, McFadden et Minshew reportent des voies de signalisation-clés impliquées dans les analyses génétiques des patients, incluant les régulateurs des cytosquelettes d'actine et de microtubules, les molécules de guidage slits, robos, ephrines et sémaphorines, les molécules d'adhésion CAMs cadhérines et neurexines, et la voie de signalisation mTOR. Cependant, peu d'études comportementales ont été réalisées chez les souris déficientes pour l'expression de protéines impliquées dans le développement axonal. De manière intéressante, parmi ces protéines, la molécule d'adhésion NrCAM et la molécule de guidage Séma6A, importantes pour le développement de la CA, ont été impliquées dans les pathologie du spectre de l'autisme chez l'Homme (Bonora et al., 2005; Hussman et al., 2011; Marui et al., 2009; Voineagu et al., 2011). Comme dans le cas des souris *Schip1*Δ10, les souris

invalidées pour l'expression de ces protéines présentent des anomalies de comportement similaires aux défauts retrouvés dans les modèles murins des maladies du spectre de l'autisme. Les souris invalidées pour l'expression de NrCAM présentent une diminution des interactions sociales et un défaut d'inversion de l'apprentissage, suggérant une rigidité et un manque d'adaptation (Moy et al., 2009). Les souris invalidées pour l'expression de la Séma6A présentent des défauts d'interactions sociales, et une altération de la reconnaissance d'objets et de la mémoire de travail (Runker et al., 2011). Il serait intéressant de pouvoir analyser l'organisation de la substance blanche chez les patients présentant des anomalies de niveau d'expression de *SCHIP1*, grâce à des techniques d'imagerie, afin d'investiguer si la fonction de la protéine chez l'Homme est comparable aux fonctions observées chez la souris.

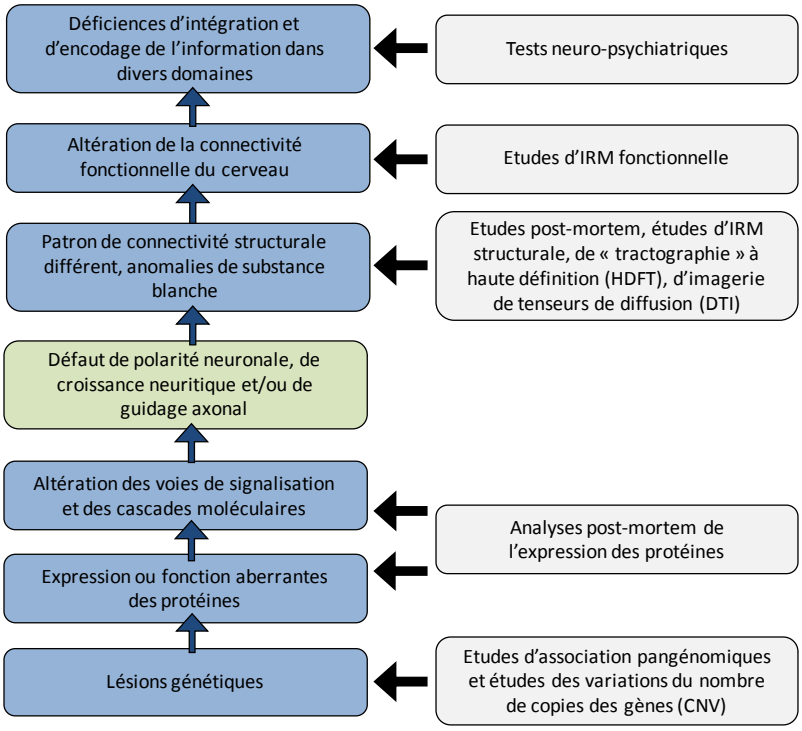


Figure 2 | Modèle de dérégulation du développement axonal dans les troubles du spectre de l'autisme (Adapté de McFadden and Minshew, 2013).

ANNEXES

I. ARTICLE 1

SCHIP-1, un partenaire de l'ankyrine G, interagit avec la spectrine βIV et participe à l'organisation structurale des nœuds de Ranvier du système nerveux périphérique.

SCHIP-1, un partenaire de l'ankyrine G, interagit avec la spectrine βIV et participe à l'organisation structurale des nœuds de Ranvier du système nerveux périphérique

- Article en préparation -

1er auteur : Pierre-Marie Martin

Contributeurs par ordre alphabétique : Jocelyne Bureau, Fabrice Chareyre, Carmen Cifuentes-Diaz, Jérôme Devaux, Marta Garcia, Marco Giovannini, Jean-Antoine Girault, Esther Klingler, Sylvie Thomasseau

Auteur correspondant : Laurence Goutebroze

Résumé :

L'isoforme IQCJ-SCHIP-1 de SCHIP-1 est concentrée aux nœuds et au segment initial de l'axone, où elle interagirait avec l'ankyrine G par l'intermédiaire de sa région C-terminale. L'étude de la localisation de IQCJ-SCHIP-1 chez des souris mutées pour l'ankyrine G ou la spectrine βIV, et au cours du développement, indiquait que IQCJ-SCHIP-1 n'était pas nécessaire pour la formation de ces structures spécialisées. Afin de mieux appréhender la fonction de SCHIP-1, des souris mutées pour le gène *Schip1* ont été générées au laboratoire (souris *Schip1*Δ10) par une stratégie de recombinaison homologue, définie pour conduire à la délétion de la région C-terminale de toutes les isoformes de SCHIP-1. La génération et la caractérisation des souris *Schip1*Δ10 sont décrites dans cette étude.

Les souris *Schip1*Δ10 présentent des anomalies motrices et sensorielles suggérant des défauts des nerfs périphériques. L'analyse morphologique des nerfs phréniques en coupes transversales montre que le nombre de fibres par nerf et le diamètre des axones sont diminués chez ces souris par rapport aux souris WT, tandis que l'épaisseur de la myéline est augmentée. Des immunomarquages fluorescents sur fibres dilacérées de nerfs sciatiques ne montrent aucune anomalie dans la localisation et l'enrichissement des principales protéines normalement localisées au niveau du nœud. Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle IQCJ-SCHIP-1 ne serait pas nécessaire à la formation du nœud. Les souris mutées présentent par contre des anomalies morphologiques des nœuds, dont le diamètre est plus grand et la longueur plus petite que chez les souris WT. Ces anomalies sont confirmées par des analyses ultrastructurales en microscopie électronique à transmission. Les souris mutées présentent en outre une

augmentation du contenu axonal en vésicules au nœud. De façon intéressante, des modifications morphologiques et structurales des nœuds, ainsi qu'une accumulation de vésicules dans des dilatations membranaires ont été observées chez des souris invalidées pour l'expression de la spectrine βIV (Lacas-Gervais et al., 2004; Uemoto et al., 2007; Yang et al., 2004). Nous montrons que IQCJ-SCHIP-1 est capable d'interagir avec l'isoforme Σ6 de la spectrine βIV lorsque les deux protéines sont exprimées dans les cellules COS-7. Le domaine C-terminal de SCHIP-1 comprenant le motif *leucine zipper* est nécessaire à cette interaction, indiquant que les protéines IQCJ-SCHIP-1 mutées exprimées chez les souris *Schip1*Δ10 ne présentent *a priori* pas la capacité d'interagir avec la spectrine βIV.

Dans leur ensemble, ces résultats indiquent que IQCJ-SCHIP-1 pourrait interagir avec l'ankyrine G et la spectrine βIV dans des complexes associés aux molécules d'adhésion et aux canaux localisés au niveau des nœuds. Ils suggèrent en outre un rôle de IQCJ-SCHIP-1 dans l'organisation structurale, et plus spécifiquement dans l'organisation du cytosquelette cortical, du nœud des fibres myélinisées périphériques.

J'ai contribué à ce travail en particulier pour la caractérisation des souris mutées Schip1Δ10. J'ai étudié l'expression des ARNs correspondant aux isoformes tronquées de SCHIP-1 *chez ces souris par RT-PCR. J'ai par ailleurs quantifié les proportions des différents génotypes dans les portées de parents hétérozygotes pour la mutation au cours du développement et analysé la présence de lait dans l'estomac des souris nouveau-nées en fonction de leur génotype.*

INTRODUCTION

SCHIP-1 was initially identified in a yeast two-hybrid screen as a partner of the tumor suppressor protein schwannomin/merlin, highly enriched in the brain (Goutebroze et al., 2000). Several SCHIP-1 isoforms, encoded by the same gene, differ by their N-terminal part and share a C-terminal domain including a ~40-residue leucin-zipper (LZ) predicted to adopt a coiled-coil conformation (Goutebroze et al., 2000, Martin et al., 2008). SCHIP-1 is able to homodimerize and to interact with other proteins through its C-terminal domain. SCHIP-1 LZ has ~50% sequence identity with human Fasciculation and Elongation protein Zeta-1 (FEZ1) and its *C. elegans* ortholog, Unc-76, involved in axonal outgrowth and fasciculation (Bloom and Horvitz, 1997).

We previously showed that a SCHIP-1 isoform, IQ-containing J protein-SCHIP-1 (IQCJ-SCHIP-1) is a component of axon initial segments (AIS) and nodes of Ranvier (NR) (Martin et al., 2008), two regions enriched in voltage-gated sodium channels (Na_v), which are essential for the generation and propagation of action potentials in myelinated fibers. Na_v are part of multimolecular complexes, which include potassium channels KCNQ2 and KCNQ3, cell adhesion molecules, neuron glia-related cell adhesion molecule (NrCAM) and neurofascin 186 (NF186), and the cytoskeletal-associated proteins ankyrin G and βIV-spectrin (Buttermore et al., 2013). We showed that SCHIP-1 directly interacts with ankyrin G which binds membrane proteins and channels, and accumulates at NRs and AISs after their formation, suggesting that it plays a role in mature NRs and AISs, possibly in the long-term stabilization or function of multimolecular complexes associated with Na_v (Martin et al., 2008).

In the present study we aimed to shed light on the possible role of SCHIP-1 *in vivo* by generating mice deficient for its expression (*Schip1*Δ10 mice). These mice are viable and fertile, but display motor and sensory dysfunctions. They do not present any consistent difference compared to wild type (WT) mice in the distribution and clustering of the major nodal components in peripheral nerves. However, the nodes are larger and thinner and show

morphological abnormalities associated with an increased number of intra-axonal vesicles. In addition, we demonstrate that SCHIP-1 is able to interact with βIV-spectrin. Thus, our observations indicate that SCHIP-1 is required to stabilize the shape and the structural organization of the nodes, possibly playing a role in cortical cytoskeleton organization.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mouse SCHIP-1 isoform identification

The sequences coding for the mouse SCHIP-1 isoforms SCHIP-1c, SCHIP-1d and IQCJs-SCHIP-1, were identified by screening the mouse genome and EST databases at NCBI using the basic local alignment search tool. The corresponding cDNAs were isolated by reverse transcription (RT)-PCR experiments from mouse brain mRNA and sequenced. The cDNA sequences were deposited in GenBank (accession numbers: SCHIP-1c, NM_013928.5; SCHIP-1d, ; IQCJs-SCHIP-1, KJ941154).

Generation of *Schip1* mutant mice

Generation of Schip1$^{flox10/+}$ ES cells

A DNA fragment containing *Schip1* exon 10 surrounded by 3.6 kb endogenous DNA upstream and 5.6 kb endogenous DNA downstream was PCR-amplified in two steps and inserted (using PCR-added *Nsi*I and *Sal*I restriction sites) in pBR322 vector containing a *NsiI-Sal*I polylinker from pBluescript KS II (Stratagene). A *lox*P sequence was added upstream from exon 10 by PCR. Next, a 2 kb *XmaI-XmaI* fragment containing a floxed PGK*Hygromycin*/*GFP* cassette was inserted 0.8 kb downstream of exon 10 (in the same orientation of the *Schip1* gene).

The *Nsi*I-*SalI Schip1-lox10* targeting fragment was electroporated into ES cells line E14 subclone IB10 (129/Ola) (Robanus-Maandag et al., 1998). For electroporation of 40 µg of supercoiled plasmid DNA into an equivalent of 40 cm^2 ES cells, a Bio-Rad Gene Pulser was used (0.8kV, 1µF, discharge 0.1 ms, 0.4 cm electrode distance, cells in 200 µl PBS). Electroporated cells were plated on 6 x 60 cm^2 mouse embryonic fibroblasts. After 24 h, selection with hygromycin B 150 µg/ml (Calbiochem) was started and continued for 3 days. Hygromycin-resistant cells were trypsinized and GFP-expressing cells were isolated by flow cytometric analysis and plated on 5 x 96-well microplates. Seven homologous recombinants out of 77 selected clones were identified by long-range PCR analysis. The caryotype of these

clones was analysed. The genomic DNAs were extracted for sequencing and Southern blot were performed to verify 5' and 3' homologous recombination a probe corresponding to the PGK*Hygromycin*/*GFP* cassette. One clone was then chosen for injection.

Generation and genotyping of Schip-1 mutant mice

Germline chimeras (*Schip1*$^{flox10HygGFP/+}$) were generated by injection of 10 *Schip1* mutant ES cells into blastocysts and crossed with C57BL/6 mice to produce outbred heterozygous offspring. The genotypes of all offspring were analyzed by on tail-tip DNA. To generate *Schip1*$^{\Delta 10/+}$ mice, *Schip1*$^{flox10HygGFP/+}$ mice were crossed with *MeuCre* deletor mice (Leneuve et al 2003). In the deriving double transgenic offspring tail DNA the *Schip1*$^{\Delta 10}$ allele was detected by PCR with primers C (5'- CAGACAGCAGACTATCATGGGG) and D (5'- AATGACTGTTCTGAGCACGG) amplifying a 551-bp product and the *Schip1*$^{+}$ allele was detected with primers A (5'- GGGTCACTAAGTTCTCCACATGA) and B (5'- TTGACCACTGAGCCATCTCTGCA) amplifying a 401-bp product. Mosaic mice carrying the *Schip1*^{flox10} and the *Schip1*$^{\Delta 10}$ alleles were subsequently crossed with C57BL/6J mice to segregate the mutant alleles and to obtain *Schip1*$^{\Delta 10/+}$ and *Schip1*$^{flox10/+}$ mice. *Schip1* mRNA expression analysis was performed by reverse transcriptions (RT) on total mRNAs prepared from brains of WT and *Schip1*Δ10 mice (ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega)), and cDNAs amplification using specific primers (sequences of primers available on request). Mice were then backcrossed on a C57BL/6J background for at least 10 generations before experiments. Research was conducted according to national and international guidelines (EC directive 86/609, French MESR 00984.01). The laboratory was approved to carry out animal experiments by the *Direction Départementale des Services Vétérinaires de Paris, Service de la Protection et de la Santé Animales et de la Protection de l'Environnement* (licence B75-05-22). The principal investigator had a personal authorization (L Goutebroze, licence 75-1533).

Behavioral tests

Four to six month-old WT and *Schip1*Δ10 mice (littermates) were tested in a battery of behavioral tests: foot printing, grid test, grip test, hot plate. All tests were performed in sound-attenuated rooms, between 9 a.m and 5 p.m. Mice were group-housed with *ad libitum* access to food and water and a 12 hours - 12 hours light-dark cycle (light phase onset at 7 a.m). Most experiments and initial quantitative analyses were performed in a 'blind' fashion, i.e., the experimenter had no knowledge of the genotype of the mice tested and analyzed.

Footprint pattern analysis. The gait analysis method was modified from de Medinaceli et al., 1982 and Ozmen et al., 2002. Mice were tested in a confined walkway 4.5-cm wide and 100-cm long with 10-cm high walls and a dark shelter at the end. Mice were trained several times to walk into the dark compartment. The footprints were obtained by dipping mice hind paws into ink, before they walked down the corridor on white paper. The footprints patterns generated were scored for angles with regard to walking direction (ImageJ software, NCBI).

Grid test. Coordination between forelimbs and hind limbs and accurate limb placement were examined by assessing the ability to walk on metal grid bars with 1.5 cm gaps on the bottom of a 30 x 20 x 20 cm box. The performance of each animal was analyzed by counting the number of errors in foot placement/total number of steps, during 2-minutes sessions, once a day, for three consecutive days. On the day prior to data collection, each mouse was allowed to walk on the grid for 2 minutes.

Wire-hanging test. The wire-hanging test was performed to measure neuromuscular strength. Mice were gently placed on a wire-cage lid, which was then slowly waved and turned upside down above the soft bedding. The hanging time for each mouse to fall onto the bedding below was measured with a cut-off time of 60 seconds.

Grip strength analysis. Forelimb grip strength was measured using a Grip Strength Meter (Biosed, Chaville, France). Mice were held by the tail and allowed to grasp a trapeze bar with their forepaws. Once the mouse grasped the bar with both paws, the mouse was pulled away from the bar until the mouse released the bar. The digital meter displays the level of tension (in grams) exerted on the bar by the mouse.

Hot plate. A standard hot plate (Biosed, Chaville, France), adjusted to 52°C, was used to assess motor reactions in response to noxious stimuli. The mouse was confined on the plate by a Plexiglas cylinder (diameter 19 cm, height 26 cm). The latency to a hind paw response (licking or shaking) or jumping, whatever happened first, was taken as the nociceptive threshold.

Electrophysiological analysis

Mice (8 month-old) were euthanized and the sciatic nerves were quickly dissected from and transferred into artificial CSF (ACSF) containing 126 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgSO_4$, 1.25 $NaH2PO_4$, 26 mM $NaHCO_3$ and 10 mM dextrose, pH 7.4-7.5. The sciatic nerves (2 cm segments) were placed in a three-compartment recording chamber, and perfused at 1-2 ml/min in ACSF equilibrated with 95%O_2-5%CO_2. The distal end was stimulated supramaximally (40 μs duration) through two electrodes isolated with petroleum jelly, and recordings were performed at the proximal ends. Signals were amplified, digitized at 500 kHz, and store on a hard disk. The duration of the CAPs was calculated at the half maximal amplitude ($V_{1/2}$). The delay of the CAPs was measured at $V_{1/2}$ and at the maximum amplitude (V_{max}). The conduction velocity was derived from the delay. For recruitment analysis, the CAP amplitude was measured and plotted as a function of the stimulation intensity. For the refractory period analysis, two successive stimuli were applied at different intervals, and the amplitude of the second CAP was measured and plotted as a function of the delay between the two stimuli.

Antibodies

Rabbit antibodies directed against SCHIP-1 (α17141 and 15013), Caspr2, neurofascin and paranodin (L51), and chicken SCHIP-1 antibody 959, were previously described (Denisenko-Nehrbass et al., 2003; Denisenko et al., 2008; Goutebroze et al., 2000; Martin et al., 2008; Menegoz et al., 1997). Antibody α16280 was obtained by immunizing rabbits with GST fused to the amino acids coded by *Schip1* exon 6. The rabbit antibody directed against the SD domain of βIV-spectrin was a generous gift of Dr Michele Solimena. The rabbit antibody directed against ankyrin G was a generous gift from Dr Ekaterini Kordeli. Commercial primary antibodies were from the following sources: HPA SCHIP-1 antibody, rabbit #HPA003445, Sigma; Na_v α-subunit, mouse clone K58/35 #S8809, Sigma; K_v1.1 α subunit, mouse clone K20/78 #75-007, NeuroMab; F3, goat #AF904, RD Systems; NrCAM, rabbit #ab24344, abcam; Flag, rabbit #F7425 or mouse clone M2 #F1804, Sigma; Myc, rabbit #2272 or mouse clone 9B11 #2276, Cell Signalling; HA, rabbit #715500, Invitrogen; rat clone 3F10 #11 867 423 001, Roche; Neuronal Class III β-tubulin, mouse clone TUJ1 #MMS-435P, Covance; Actin, mouse clone C4 #MAB1501, Millipore. Secondary antibodies for immunohistochemistry (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546 or Alexa Fluor 633 conjugated) were from Molecular Probes. Secondary antibodies for immunobloting (IRDye^{TM}800CW or IRDye^{TM}700CW) were from Rockland Immunochemicals.

Immunohistochemistry and image analysis

For SCHIP-1 immunostaining, sciatic nerves from adult wild type and mutant animals were dissected, frozen in isopentane and stored at –20°C. Ten µm-thick longitudinal sections were then produced using a cryostat (Microm Microtech, France). For all the other immunostainings, dissected sciatic nerves were fixed in 2% PFA for 30 min at RT, teased apart to yield single fiber preparations, air dried and kept at –20°C. Immunofluorescent stainings were performed as described previously (Goutebroze et al., 2003). Briefly, slides were fixed for 20 min in methanol/acetone (50/50 V/V) at -20°C or treated with 0.1M glycine

for 30 min, pre-incubated for 1 hour at room temperature in 0.2% porcine skin gelatin and 0.25 % Triton X-100 in PBS (PGT buffer), before incubation with primary antibodies (diluted in PGT) overnight at 4°C. After washing with PBS, coverslips were incubated for 2 hours at room temperature with secondary antibodies (diluted in PGT), washed again with PBS, and mounted in Vectashield. Images were acquired using a Leica SP5 confocal laser-scanning microscope (Leica). Measurements of node width (perpendicular to the axon axis) and length (parallel to the axon axis) were performed on images of NrCAM labelings acquired with a DM6000-2 Leica microscope equipped with a CCD camera, using ImageJ software.

Electron microscopy and morphometry

Mice were anesthetized with pentobarbital and perfused with 0.9% NaCl, followed by 4% paraformaldehyde and 3% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB). The sciatic and phrenic nerves were removed and placed in fresh fixative overnight at 4°C, rinsed in PB, post-fixed in 2% OsO4 in PB, dehydrated in an ascending series of ethanol, and embedded in epoxy resin. Morphometric analyses were performed on 0.5 µm-thick semi-thin transversal sections of phrenic nerves stained with toluidine blue and viewed with a DM6000 Leica microscope (3 different mice of each genotype). Fibers and axons diameters, and g-ratios, defined as ratios of axonal to fiber's diameter, were measured with DigitalMicrograph software (Gatan, Pleasanton, CA USA), for more than 100 fibers. Ultrastructural studies were performed on phrenic nerve transversal sections and sciatic nerve longitudinal sections. Ultra-thin sections (40 nm) were stained with Reynold's lead citrate and uranyl acetate, and viewed with a Philipps CM-100 TEM electron microscope. Images were acquired using an Orius (Gatan, Pleasanton, CA USA) digital camera. Ten nodes of Ranvier were examined in longitudinal sections of sciatic nerves from 2- and 10-month-old mice of each genotype (at least 2 mice per group). Quantification of the number of vesicles per node section and the distance between microtubules and mitochondria were performed on phrenic nerve transversal sections using the DigitalMicrograph software (Gatan, Pleasanton, CA, USA).

Lysates preparation and immunoblotting

Sciatic nerves of mice were dissected out and homogenized in a Dounce vessel containing 200 µl of a lysis buffer containing 10 mM NaPi buffer pH 7.8, 59 mM NaCl, 1% Triton-X100, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 10% glycerol, 25 mM β-glycerophosphate, 50 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4 and Complete proteases inhibitors (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Homogenates were centrifuged 30 min at 4°C at 15 000 rpm, and protein concentration in the supernatants was determined by the bicincholinic acid method (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Equal amounts of protein (40 µg) were loaded in NuPAGE Bis-Tris gels (Invitrogen). Proteins were transferred to 0.45 µm Nitrocellulose membrane in 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 192 mM glycine, and 20% ethanol. Membranes were blocked with 5% dry milk in TBS-Tween 0.1% (TBST) 1 hour at room temperature, incubated with primary antibodies in the same buffer for two hours and then 1 hour with appropriate IRDye-conjugated secondary antibodies, and developed and quantified using Odyssey Imaging System (LI-COR Biosciences).

Plasmid constructs

For expression in COS-7 cells of FLAG-tagged IQCJ-SCHIP-1, the mouse cDNA of IQCJ-SCHIP-1 was cloned by PCR into the pFLAG-CMV-2 vector (Sigma). The expression vectors for the Myc-tagged Σ6 isoform of βIV-spectrin and the HA-tagged βIV-spectrin C-terminal part were generous gifts from Dr Masayuki Komada (Komada and Soriano, 2002) and Dr Michele Solimena (Berghs et al., 2000), respectively. Vectors expressing mutant IQCJ-SCHIP-1 and βIV-spectrin proteins were obtained by site-directed mutagenesis.

Cell cultures and co-immunoprecipitations

COS-7 cells were transfected using ExGen 500 (Euromedex) using 10µg of plasmid/2.10^6 cells/10mm-diam-dish and were grown 24 hours before processing. Co-immunoprecipitations were performed essentially as previously described (Traka et al., 2003). The extraction buffer

and the washing buffer contained 50 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 and Complete (Roche), and 50 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, and 0.5% Triton X-100 and Complete (Roche), respectively. Precipitated proteins were loaded in NuPAGE Bis-Tris gels (Invitrogen) and immoblots were performed as described above.

RESULTS

*Schip1*Δ10 mutant mice are viable and fertile

Three different isoforms of SCHIP-1 were previously described in mouse and human (SCHIP-1a, SCHIP-1b, IQCJ-SCHIP-1; Figure 1A) (Martin et al., 2008). Using a combination of data base miming and RT/PCR experiments, we demonstrated that three additional isoforms encoded by the gene *Schip1*, were also expressed in the mouse brain (SCHIP-1c, SCHIP-1d, IQCJs-SCHIP-1; Figure 1A). All SCHIP-1 isoforms differ by their N-terminal part and share a C-terminal domain including a ~40-residue leucin-zipper (LZ) predicted to adopt a coiled-coil conformation (Figure 1A). We generated SCHIP-1 mutant mice in which exon 10 of *Schip1* was deleted, using a three-lox recombination strategy (Figure 1B). Deletion of exon 10 was predicted to introduce a premature stop codon in the conserved C-terminal domain common to all SCHIP-1 isoforms, leading to the expression of mutant proteins, if any, lacking their 194-residue C-terminal part and with a novel unrelated 50 residues extension. The deletion of exon 10 was verified by genomic PCR (Figure 1C) and RT-PCR (data not shown). Using isoform specific primers, low levels of mutant mRNAs were detected that correspond to isoform cDNAs deleted of the nucleotides of exon 10 (Δexon10) as expected, but also of exons 10 and 11 (Δexon10-11), and exons 10, 11 and 12 (Δexon10-11-12) (Figure 1D for SCHIP-1a and IQCJ-SCHIP-1, data not shown for the other isoforms). Deletions of exons 10-11 and exons 10 to 12 were also expected to introduce a premature stop codon in the conserved C-terminal domain common to all SCHIP-1 isoforms (Figure 1E). All predicted mutated proteins thus lack the C-terminal residues required for ankyrin G binding and oligomerization. Loss of full-length endogenous SCHIP-1 protein was verified by immunoprecipitation experiments on brain extracts followed by immunoblotting using different combinations of SCHIP-1 antibodies (Figure 1F). C-terminal truncated proteins were not detectable.

At weaning time, homozygous mutant mice (*Schip1*Δ10) born from heterozygous crossings represented only ~14% of total mice while the expected mendelian ratio of

homozygous embryos was observed at E14.5 and E.16.5 (Figure 1G), suggesting some late embryonic and/or early life lethality. Lack of detectable milk in the stomach of nearly 60% homozygous mutant newborn mice (P0) indicated that mutant pups might have difficulties to feed. Adult *Schip1*Δ10 mice appeared normal, were fertile and survived as old as WT mice (> 2 years), but suffered from a mild growth delay from birth to adulthood (data not shown).

*Schip1*Δ10 mice display motor and sensory dysfunctions

Although casual inspection showed that *Schip1*Δ10 mice moved around normally in their home cages, they almost never hung from the cover grid. Attentive observation revealed subtle walking problems, including abnormal hind limb spreading, confirmed by footprint patterns analysis (Figure 2A). Tests of motor ability function such as grid test (Figure 2B) and hanging wire test (Figure 2C), respectively, revealed impairments. However, the muscular strength of *Schip1*Δ10 mice evaluated by the grip test did not show any deficit (Figure 2D). An increased in reaction time was observed when mice were placed on a hot plate (Figure 2E), indicating an alteration in nociception and slightly reduced pain sensitivity. Thus, mutant mice displayed some degree of ataxia and a reduced pain sensitivity, which could correspond to sensory defects of the peripheral nerves although these symptoms may also involve defects of the CNS.

Alteration of PNS myelinated fibers in *Schip1*Δ10 mice

Behavioral deficits of *Schip1*Δ10 mice prompted us to investigate peripheral nerve functions and morphology. Electrophysiological measurements showed that sciatic nerve conduction was not significantly different between mutant and WT littermates (Figure 3A, 3B). However, compound action potentials (CAPs) duration was increased in mutant mice, suggesting a mild conduction defect in small caliber fibers. The refractory period (Figure 3C) and the recruitment (Figure 3D) of the CAPs were virtually identical in both genotypes.

Examination of semi-thin transversal sections of phrenic nerves (Figure 4A) revealed a significant decrease in fibers number in *Schip1*Δ10 mice as compared to WT mice (WT: 241 ± 7.2 axons; *Schip1*Δ10: 191.3 ± 7.9; n=3 mice/genotype; **p<0.01), suggesting axonal alterations. In addition the endoneurial space appeared denser in *Schip1*Δ10 mice (Figure 4A). Electron microscopy showed that axon shape and myelination were globally normal, even though the diameter of the axons was decreased (WT: 6.01 ± 0.08 µm, n=326; *Schip1*Δ10: 5.68 ± 0.09 µm, n=294; **p<0.01) and the myelin thickness was increased, as indicated by a significant reduction of the g-ratio (WT: 0.792 ± 0.001, n=326; *Schip1*Δ10: 0.754 ± 0.002, n=294; ***p<0.001) (Figure 4B, 4C). In register with the denser endonerial space, collagen pockets were observed in between myelinated fibers in *Schip1*Δ10 mice but not in WT mice (data not shown). Furthermore, in WT mice, groups of unmyelinated fibers were regularly surrounded by a single Schwann cell process (Remak fibers) whereas in *Schip1*Δ10 mice, Schwann cell processes often made several turns around small caliber axons (data not shown).

Morphological alterations of PNS nodes in *Schip1*Δ10 mice

To evaluate the importance of SCHIP-1 in the organization and/or maintenance of mature nodes we examined sciatic nerve fibers of young (2.5 month-old) and older (13-14 month-old) *Schip1*Δ10 mice. Immunofluorescence study surprisingly revealed SCHIP-1 immunolabeling at the nodes identified by Na_v immunostaining, with two different antibodies directed to the first 97 N-terminal residues (Figure 5A) and the central residues (183 to 377) (Figure 5B) of IQCJ-SCHIP-1, respectively. This strongly indicated that IQCJ-SCHIP-1 truncated proteins were stably expressed and transported in peripheral axons of *Schip1*Δ10 mice, and still able to localize at the nodes. Further immunolabelings showed that markers of paranodal (Paranodin/Caspr, Pnd; Contactin/F3, F3) and juxtaparanodal (K_v1.1) domains were unaltered in *Schip1*Δ10 fibers (Figure 5C, 5D). In addition there was no consistent difference in the distribution and clustering of the major membrane proteins of nodes in

mutant mice compared to WT mice in the axolemma, including Na^+ channels (Na_v), NrCAM and KCNQ2, as well as the cytoskeletal proteins ankyrin G and βIV-spectrin (Figure 5D). Immunoblotting showed that the proteins levels were not significantly altered (Figure 5E). This indicated that the C-terminal domain if IQCJ-SCHIP-1 is not critical for nodal proteins localization and enrichment. However, a detailed examination revealed a significant increased width of the nodes (perpendicular to the axon axis), together with a significant decreased in their length (parallel to the axon axis), in mutant mice as compared to WT mice (Figure 5F). These morphological abnormalities were observed in old mice as well as in 2.5 month-old mice.

Ultrastructural alterations of PNS nodes in *Schip1*Δ10 mice

To determine whether morphological abnormalities correspond to alterations in the ultrastructure of the nodes, we performed electron microscopy analysis on ultra-thin longitudinal sections of the nerves. This analysis confirmed the presence of *Schip1*Δ10 NRs larger and shorter than the WT ones (Figure 6A), suggesting that IQCJ-SCHIP-1 is required to stabilize the structural organization and the shape of the nodes. It further revealed a suspicious increased number of intra-axonal vesicles in the nodal regions of *Schip1*Δ10 mice as compared to WT mice (Figure 6A, arrows). Quantification on ultra-thin transversal sections of phrenic nerves indeed showed a significant increased number of vesicles (Figure 6B), some with an electron-dense core (Figure 6B, arrows), in the nodal regions of *Schip1*Δ10 mice (WT: 7.787 ± 0.456 vesicles/section, n=75; *Schip1*Δ10: 12.89 ± 0.853 vesicles/section, n=65; ***p<0.001).

Moreover and interestingly, a detail examination of cytoskeleton in transversal sections revealed the presence of microtubules strings closely associated with mitochondria in nodal (Figure 6C) but also internodal regions (Figure 6D) of mutant fibers. We quantified the number of microtubules localized as closer as 30 nm of each mitochondria. This number was significantly higher both in the nodes (WT: 14.55 ± 1.395 microtubules/mitochondria,

n=49; *Schip1*Δ10: 22.61 ± 1.931 microtubules/mitochondria, n=44; ***p<0.001) and in the internodes (WT: 5.538 ± 0.251 microtubules/mitochondria, n=117; *Schip1*Δ10: 9 ± 0.274 microtubules/mitochondria, n=126; ***p<0.001) of mutant mice. Expect this, we did not observed obvious abnormalities in neurofilament density or organization in internodal regions. Immunoblot analysis showed no change in the levels of neurofilament subunits NF-L, NF-M and NF-H (Figure 6E).

IQCJ-SCHIP-1 interacts with βIV spectrin

Shape modifications and structural organization abnormalities of nodes as well as vesicles accumulation were observed by others in βIV spectrin mutant mice (Lacas-Gervais et al., 2004; Uemoto et al., 2007; Yang et al., 2004). We previously showed that the accumulation of IQCJ-SCHIP-1 at central and peripheral nodes is altered in qv_{3J} βIV spectrin mutant mice (Martin et al., 2008). Altogether these observations prompted us to analyze the possibility that IQCJ-SCHIP-1 could form a complex with βIV spectrin. Six βIV spectrin alternative splice variants have been reported (Σ1-Σ6) (Berghs et al., 2000; Komada and Soriano, 2002; Tse et al., 2001). βIVΣ1 consists of a N-terminal actin-binding domain (CH), 17 tandem spectrin repeats, a variable region (SD), and a pleckstrin homology domain (PH) (Figure 7A). βIVΣ6 lacks the N-terminal actin binding domain and the first 10 spectrin repeats (Figure 7A). Both βIVΣ1 and βIVΣ6 are present at the nodes (Lacas-Gervais et al., 2004). βIVΣ6 is expressed at much higher levels than βIVΣ1 and is specifically required for Nav clustering (Komada and Soriano, 2002; Uemoto et al., 2007). We therefore performed coimmunoprecipitation experiments on lysates from transfected COS-7 cells expressing either Flag-tagged IQCJ-SCHIP-1 (Flag-IQCJ) or Myc-tagged βIVΣ6 (Myc-βIVΣ6) alone, or both proteins. Immunoprecipitation with Flag antibodies pulled down Myc-βIVΣ6 in doubly transfected cells but not in cells expressing only Myc-βIVΣ6 (Figure 7B). Reciprocally, Myc antibodies pulled down Flag-IQCJ (Figure 7C). These results demonstrated that IQCJ-SCHIP-1 is indeed able to interact with βIVΣ6. We then performed the same experiments with an IQCJ-SCHIP-1

protein deleted of its last 74 C-terminal residues corresponding to the leucin-zipper motif (Flag-IQCJΔ). Flag-IQCJΔ did not coprecipitated with Myc-βIVΣ6 (Figure 7C), suggesting that IQCJ-SCHIP-1 truncated proteins expressed in *Schip1*Δ10 mice might not be able to associate with βIV spectrin.

The qv_{3J} mutant mice have a single point mutation in the C-terminal SD domain, resulting in a novel 49 residues extension and lacking the (PH) domain (Figure 6A). We determine whether this mutation might affect the interaction with IQCJ-SCHIP-1. Coimmunoprecipitation of IQCJ-SCHIP-1 with the corresponding βIVΣ6 mutant protein (Myc-βIVΣ6qv_{3J}) was strongly decreased as compared to that observed with wild type βIVΣ6 (Figure 7D). The interaction was similarly impaired with a mutant βIVΣ6 protein lacking the SD and PH domains (Myc-βIVΣ6Δ1, deleted of the last 442 amino acids), and for a mutant βIVΣ6 protein lacking in addition part of the spectrin repeat 17 (Myc-βIVΣ6Δ2, deleted of the last 494 amino acids) (Figure 7A, 7D). Conversely, the C-terminal part of βIV spectrin corresponding to its last 494 C-terminal residues (HA-βIVΔCter) pulled down with Flag-IQCJ, but not with Flag-IQCJΔ (Figure 7A, 7E). Altogether these observations indicated that the interaction of βIV spectrin with IQCJ-SCHIP-1 is dependent from its C-terminal domain.

REFERENCES

Berghs S, Aggujaro D, Dirkx R, Jr., Maksimova E, Stabach P, Hermel JM *et al* (2000). betaIV spectrin, a new spectrin localized at axon initial segments and nodes of ranvier in the central and peripheral nervous system. *J Cell Biol* **151:** 985-1002.

Bloom L, Horvitz HR (1997). The Caenorhabditis elegans gene unc-76 and its human homologs define a new gene family involved in axonal outgrowth and fasciculation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94:** 3414-3419.

Buttermore ED, Thaxton CL, Bhat MA (2013). Organization and maintenance of molecular domains in myelinated axons. *J Neurosci Res* **91:** 603-622.

de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ (1982). An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* **77:** 634-643.

Denisenko-Nehrbass N, Goutebroze L, Galvez T, Bonnon C, Stankoff B, Ezan P *et al* (2003). Association of Caspr/paranodin with tumour suppressor schwannomin/merlin and beta1 integrin in the central nervous system. *J Neurochem* **84:** 209-221.

Denisenko N, Cifuentes-Diaz C, Irinopoulou T, Carnaud M, Benoit E, Niwa-Kawakita M *et al* (2008). Tumor suppressor schwannomin/merlin is critical for the organization of Schwann cell contacts in peripheral nerves. *J Neurosci* **28:** 10472-10481.

Goutebroze L, Brault E, Muchardt C, Camonis J, Thomas G (2000). Cloning and characterization of SCHIP-1, a novel protein interacting specifically with spliced isoforms and naturally occurring mutant NF2 proteins. *Mol Cell Biol* **20:** 1699-1712.

Goutebroze L, Carnaud M, Denisenko N, Boutterin MC, Girault JA (2003). Syndecan-3 and syndecan-4 are enriched in Schwann cell perinodal processes. *BMC Neurosci* **4:** 29.

Komada M, Soriano P (2002). [Beta]IV-spectrin regulates sodium channel clustering through ankyrin-G at axon initial segments and nodes of Ranvier. *J Cell Biol* **156:** 337-348.

Lacas-Gervais S, Guo J, Strenzke N, Scarfone E, Kolpe M, Jahkel M *et al* (2004). BetaIVSigma1 spectrin stabilizes the nodes of Ranvier and axon initial segments. *J Cell Biol* **166:** 983-990.

Leneuve P, Colnot S, Hamard G, Francis F, Niwa-Kawakita M, Giovannini M *et al* (2003). Cre-mediated germline mosaicism: a new transgenic mouse for the selective removal of residual markers from tri-lox conditional alleles. *Nucleic Acids Res* **31:** e21.

Martin PM, Carnaud M, Garcia del Cano G, Irondelle M, Irinopoulou T, Girault JA *et al* (2008). Schwannomin-interacting protein-1 isoform IQCJ-SCHIP-1 is a late component of nodes of Ranvier and axon initial segments. *J Neurosci* **28:** 6111-6117.

Menegoz M, Gaspar P, Le Bert M, Galvez T, Burgaya F, Palfrey C *et al* (1997). Paranodin, a glycoprotein of neuronal paranodal membranes. *Neuron* **19:** 319-331.

Ozmen S, Ayhan S, Latifoglu O, Siemionow M (2002). Stamp and paper method: a superior technique for the walking track analysis. *Plast Reconstr Surg* **109:** 1760-1761.

Robanus-Maandag E, Dekker M, van der Valk M, Carrozza ML, Jeanny JC, Dannenberg JH *et al* (1998). p107 is a suppressor of retinoblastoma development in pRb-deficient mice. *Genes Dev* **12:** 1599-1609.

Traka M, Goutebroze L, Denisenko N, Bessa M, Nifli A, Havaki S *et al* (2003). Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *J Cell Biol* **162:** 1161-1172.

Tse WT, Tang J, Jin O, Korsgren C, John KM, Kung AL *et al* (2001). A new spectrin, beta IV, has a major truncated isoform that associates with promyelocytic leukemia protein nuclear bodies and the nuclear matrix. *J Biol Chem* **276:** 23974-23985.

Uemoto Y, Suzuki S, Terada N, Ohno N, Ohno S, Yamanaka S *et al* (2007). Specific role of the truncated betaIV-spectrin Sigma6 in sodium channel clustering at axon initial segments and nodes of ranvier. *J Biol Chem* **282:** 6548-6555.

Yang Y, Lacas-Gervais S, Morest DK, Solimena M, Rasband MN (2004). BetaIV spectrins are essential for membrane stability and the molecular organization of nodes of Ranvier. *J Neurosci* **24:** 7230-7240.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Generation of *Schip1* mutant mice.

A, Schematic representation of mice isoforms of *Schip1*. *Schip1* is composed of 14 exons localized on chromosome 3. Exons common to all isoforms are in black. Grey boxes correspond to exons specific for one or two isoforms only. ***B***, Schematic representation of *Schip1* gene-targeting three-lox strategy. Upper panel, *Schip1* genomic locus including exons 10, 11 and 12. Middle panel, targeting vector with the three *lox*P sites (black arrowheads) flanking exon 10 and the selection cassette PGK*Hygromycin*/*GFP* (PGK*Hygro*/*GFP*). Lower panel, *Schip1* mutant allele obtained after *in vivo* Cre recombination. Positions of primers used for genotyping (A-D) are indicated. ***C***, PCR analysis on genomic DNAs of WT, heterozygous (HET) and homozygous *Schip1*Δ10 (Δ10) mice indicating disruption of *Schip1* WT allele (401 bp band) and the presence of mutant allele (551 bp band). ***D***, RT-PCR analysis of SCHIP-1a and IQCJ-SCHIP1 mRNAs from WT and *Schip1*Δ10 mice at post-natal day 1 (P1) and 3 months, showing DNA fragments corresponding to cDNAs deleted of the nucleotides of exon 10 (Δ10), exons 10 and 11 (Δ10-11), and exons 10, 11 and 12 (Δ10-12). ***E***, Predicted C-terminal amino acid sequences of SCHIP-1 mutant proteins. Dashed lines substitute for 147 amino acids. ***F***, SCHIP-1 expression in brain of WT and *Schip1*Δ10 mice. Immunoprecipitations performed with two different antibodies, α17141 and HPA, followed by immunoblotting (IB) with the antibody α16280, reveal a protein at the expected molecular weight for IQCJ-SCHIP-1 in WT brain extracts (arrow) which is not detected in *Schip1*Δ10 brain extracts. Ig, immunoglobulins. ***G***, Percentage of WT, heterozygous (HET) and homozygous *Schip1*Δ10 embryos at E14.5 and E.16.5, and mice at weaning time (3-4 weeks) arising from heterozygous crossings. n, number of embryos or mice. Statistical test, Chi2.

Figure 2. Ataxia and hypoalgesia in *Schip1*Δ10 mice.

A, Representative ink footprint patterns (left panel) revealed abnormal spreading of hind limbs for *Schip1*Δ10 (Δ10) mice. Gray lines were draw to measure footprint angle with regard to walking direction (right panel) (n=6 mice/genotype). ***B***, Grid test. When walking on a grid *Schip1*Δ10 mice slipped more often than WT mice (n= mice/genotype). ***C***, Hanging wire test. The latency to fall down from the grid was significantly shorter for *Schip1*Δ10 mice than for WT mice (n= mice/genotype). ***D***, Grip strength analysis. Motor deficits of *Schip1*Δ10 mice did not appear to be due to muscle weakness, as the grip strength of these mice was similar to that of WT mice (n=7-8 mice/genotype). ***E***, Hot plate test. On a heated plate at 52°C, paw withdrawal latency was increased for *Schip1*Δ10 mice compared to WT mice (n=18-29 mice/genotype). Data are means ± SEM. *p<0.05, **p<0.01.

Figure 3. Electrophysiological characteristics of sciatic nerves of *Schip1*Δ10 mice. ***A***, Representative compound action potentials (CAP) recorded on sciatic nerves from WT and *Schip1*Δ10 (Δ10) mice. The lower trace is a superposition of the WT and *Schip1*Δ10 CAPs recordings. WT, grey; Δ10, dotted line. ***B***, Nerve conduction characteristics. CAP duration was calculated at the half maximal amplitude ($V_{1/2}$). Conduction velocities (CV) were derived from the delay of the CAPs measured at $V_{1/2}$ or V_{max}. n represents the number of nerves tested. Statistical analysis, two-tailed *t*-test for two samples of equal variance, **p<0.01. ***C***, Recruitment of sciatic nerve axons. ***D***, Refractory period. (***C, D***) The error bars represent standard deviation.

Figure 4. Structural abnormalities in phrenic nerves from *Schip1*Δ10 mice

A, Transversal semi-thin sections of phrenic nerves of 10 month-old WT and *Schip1*Δ10 (Δ10) mice. ***B***, Low magnification electron micrographs showing an apparent hypermyelination of the fibers in *Schip1*Δ10 mice compared to WT littermates. ***C***, G-ratio as

a function of axon diameter. Data are means ± SEM. *p<0.05; ***p<0.001. Scale bars: (***A***), 8 µm; (***B***), 0.7 µm.

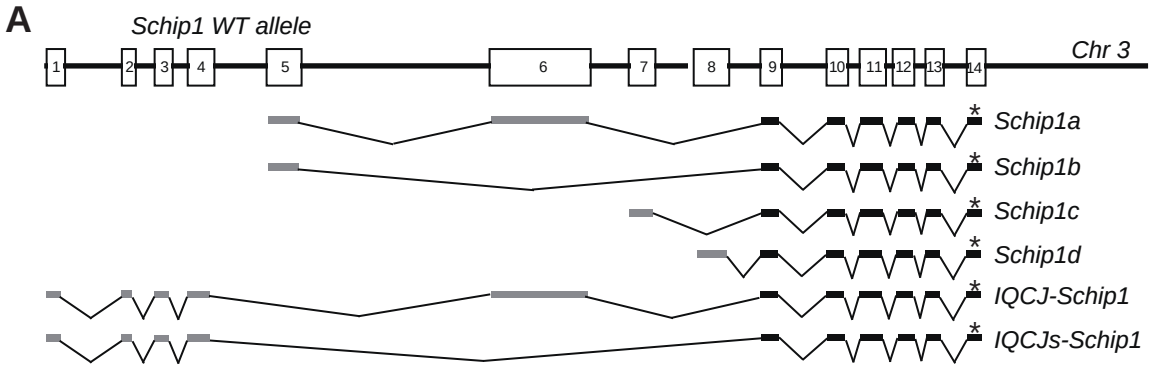
Figure 5. Alteration of PNS nodes in *Schip1*Δ10 mice

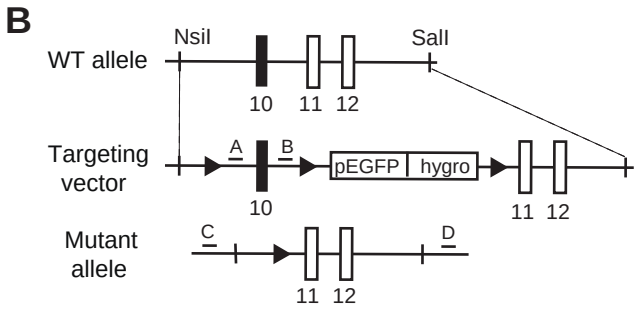
A, B, Longitudinal sections of sciatic nerves from 10 month-old WT and *Schip1*Δ10 (Δ10) mice double-stained for Na_v channels (red) and SCHIP-1 (green) with antibody 17141 (***A***) or antibody 15013 (***B***). ***C, D,*** Teased fibers of sciatic nerves from 10 month-old WT and *Schip1*Δ10 mice double-stained for proteins of Ranvier nodes. (***C***) Caspr/paranodin [Pnd] (green) and $K_v1.1$ (red). (***D***) NrCAM, KCNQ2, ankyrin G [AnkG], βIV spectrin [βIV] (green); Na_v, contactin/F3 [F3] (red). ***E***, Proteins expression in sciatic nerves from 8 month-old WT and *Schip1*Δ10 mice evaluated by immunoblotting. Pnd, Caspr/paranodin; NF155/NF186, 155/186 kDa isoforms of neurofascin; AnkG, ankyrin G; β3-tub, neuronal β tubulin. ***F***, Width (perpendicular to axon axis) and length (parallel to axon axis) of nodes in sciatic nerves of 2.5 month-old and 14 month-old WT and *Schip1*Δ10 mice. Data are means ± SEM. ***p<0.001. Scale bars: 5 µm.

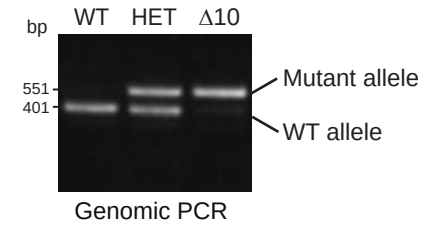
Figure 6. Ultrastructural abnormalities of peripheral nerves in *Schip1*Δ10 mice. *A*, Electron micrographs of sciatic nerve longitudinal sections at the level of the node of 10 month-old mice confirming the presence of larger and shorter nodes in *Schip1*Δ10 (Δ10) mice, and revealing a suspicious increased number of intra-axonal vesicles (arrows). *a'* and *b'* correspond to high magnification of *a* and *b* at the level of the nodes. Dashed lines delineate the nodes. ***B-D***, Electron micrographs of phrenic nerve transversal sections of 10 month-old mice. Sections at the level of the node show that the axon of the *Schip1*Δ10 mice contained a higher number of vesicles (***B***, arrows) compared to the WT axon and string of microtubules closed to mitochondria (***C***, arrowheads). Microtubules strings closed to mitochondria were also observed on internodal sections of *Schip1*Δ10 mice axons (***D***, arrowheads). Expression of neurofilament subunits NF-H, NF-M and LF-L, in sciatic nerves

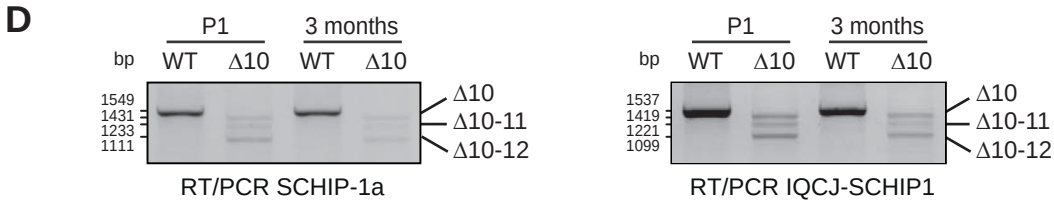
from 8 month-old WT and *Schip1*Δ10 mice evaluated by immunoblotting. β3-tub, neuronal β tubulin. Scale bars: (***A***), 0.5 µm; (***B, C***), 200 nm; (***D***), 100 nm.

Figure 7. Association of IQCJ-SCHIP-1 and βIV spectrin in transfected COS-7 cells. ***A***, Schematic representation of the domain structure of βIVΣ1 spectrin and of wild type and mutant tagged βIVΣ6 spectrin proteins. CH, calponin homology; SD, variable region; PH, pleckstrin homology domain. Dashed line substitutes for spectrin repeats 2 to 9. ***B***, Association of IQCJ-SCHIP-1 and βIVΣ6. Lysates from transfected COS-7 cells overexpressing Flag-tagged IQCJ-SCHIP-1 (Flag-IQCJ) and Myc-tagged βIVΣ6 (Myc-βIVΣ6), were subjected to immunoprecipitation (IP) with Flag (αFlag) antibodies. Precipitates were analyzed by immunoblotting (IB) with antibodies directed against SCHIP-1 (α959) and Myc (αMyc). Aliquots of crude protein extracts (Lysates) were also subjected to immunoblotting to verify the expression of the proteins. Flag antibodies coimmunoprecipitate Myc-βIVΣ6 only in doubly transfected cells. ***C, D***, IQCJ-SCHIP-1/βIVΣ6 interaction required the C-terminal domains of the proteins. Lysates from transfected COS-7 cells overexpressing wild type or mutant Flag-IQCJ and/or wild type or mutant Myc-βIVΣ6, were subjected to immunoprecipitation (IP) with Myc antibodies and immunopreciptated proteins were detected as in *B*. Myc antibodies pull-down IQCJ-SCHIP-1 (Flag-IQCJ), but not IQCJ-SCHIP-1 deleted of its C-terminal leucin-zipper (Flag-IQCJΔ) (***C***). Flag-IQCJ does not coimmunoprecipitate with βIVΣ6 mutant proteins Myc-βIVΣ6*qv3j*, Myc-βIVΣ6Δ1 and Myc-βIVΣ6Δ2 lacking part of the C-terminal domain. ***E***, IQCJ-SCHIP-1 interacts with the C-terminal domain of βIV spectrin. Coimmunoprecipitations were performed as in *A* on lysates of transfected COS-7 cells expressing Flag-IQCJ or Flag-IQCJΔ and/or the HA-tagged C-terminal domain of βIV spectrin (HA-βIVCter). HA-βIVCter coimmunoprecipitates with Flag-IQCJ but not with Flag-IQCJΔ.



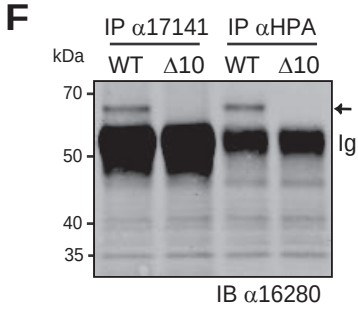






E

WT	PGIYTSCSKSGKPSLSARLQSGMNLQICFVNDSGSDKDSDADDSKTETSLDTPLSPMSKQSSSY - - - - -PAK*
	exon 9 *exon 10* *exon 11*
Δ10	PGIYTSCSKSGKPSLSAR*ASRVLPITIETQLRRSLNPWMTWTSSQGKRSYKLKPKWLWPWPNQWPKCK**
Δ10-11	PGIYTSCSKSGKPSLSAR*SHTCLT**
Δ10-12	PGIYTSCSKSGKPSLSAR*FE**



G

Age	E14.5		E16.5		Weaning time	
Genotype	n	%	n	%	n	%
WT	63	26.9	19	23.2	218	35.4
HET	105	44.9	42	51.2	314	51
Δ10	66	28.2	21	25.6	83	**13.6**
p value	0.477		0.928		**<0.0001**	

Figure 1

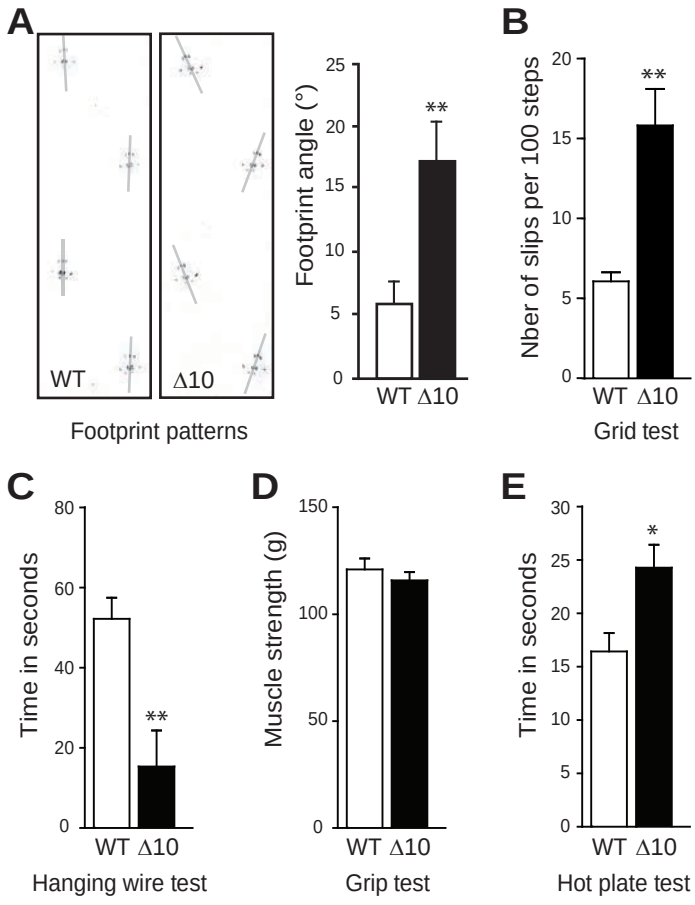
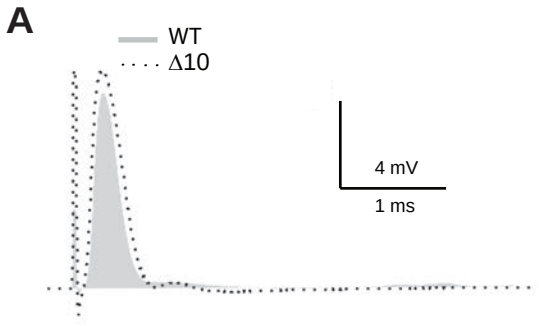
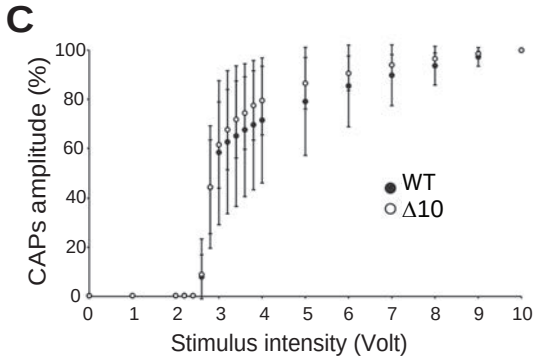

A
WT
Δ10
Footprint patterns
Footprint angle (°)
25
20
15
10
5
0
**
WT Δ10
B
Nber of slips per 100 steps
20
15
10
5
0
**
WT Δ10
Grid test
C
Time in seconds
80
60
40
20
0
**
WT Δ10
Hanging wire test
D
Muscle strength (g)
150
100
50
0
WT Δ10
Grip test
E
Time in seconds
30
25
20
15
10
5
0
*
WT Δ10
Hot plate test

Figure 2



B

	WT	Δ10
CAP amplitude (mV)	8.7 ± 2.9	11.3 ± 2.8
CAP area (mV.ms)	1097 ± 418	1732 ± 460
CAP duration (ms)	**0.24 ± 0.02**	**0.28 ± 0.03****
$CV_{V1/2}$ ($m.s^{-1}$)	71.3 ± 7.6	68.8 ± 5.3
CV_{Vmax} ($m.s^{-1}$)	48.7 ± 4.7	45.5 ± 2.7
n	8 (4 mice)	9 (5 mice)



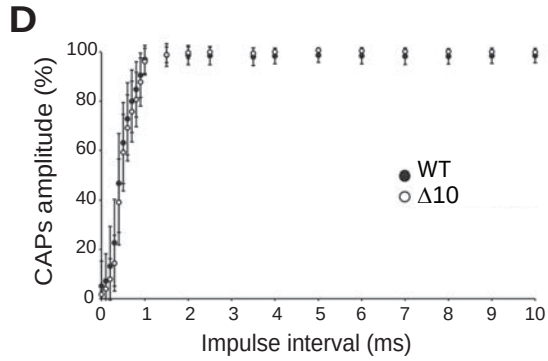


Figure 3

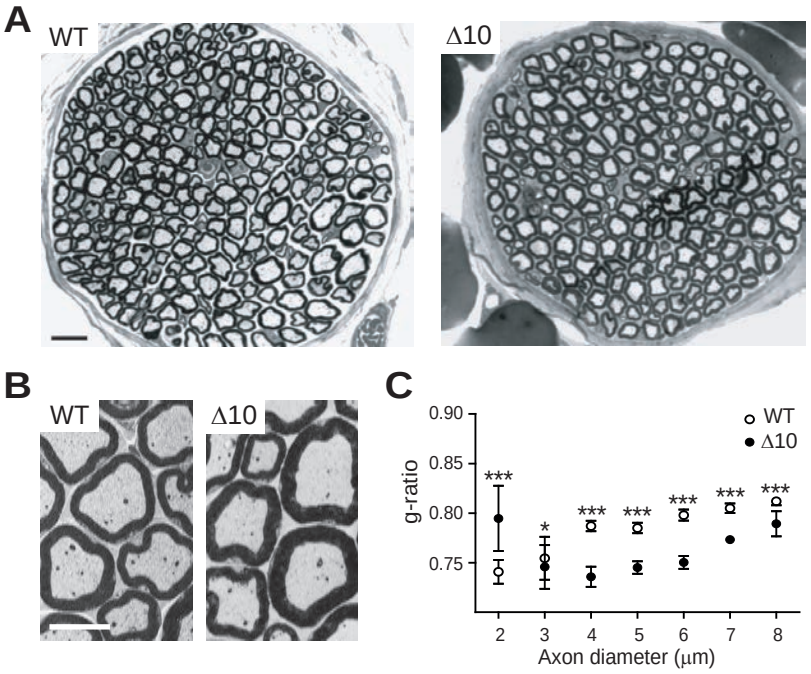
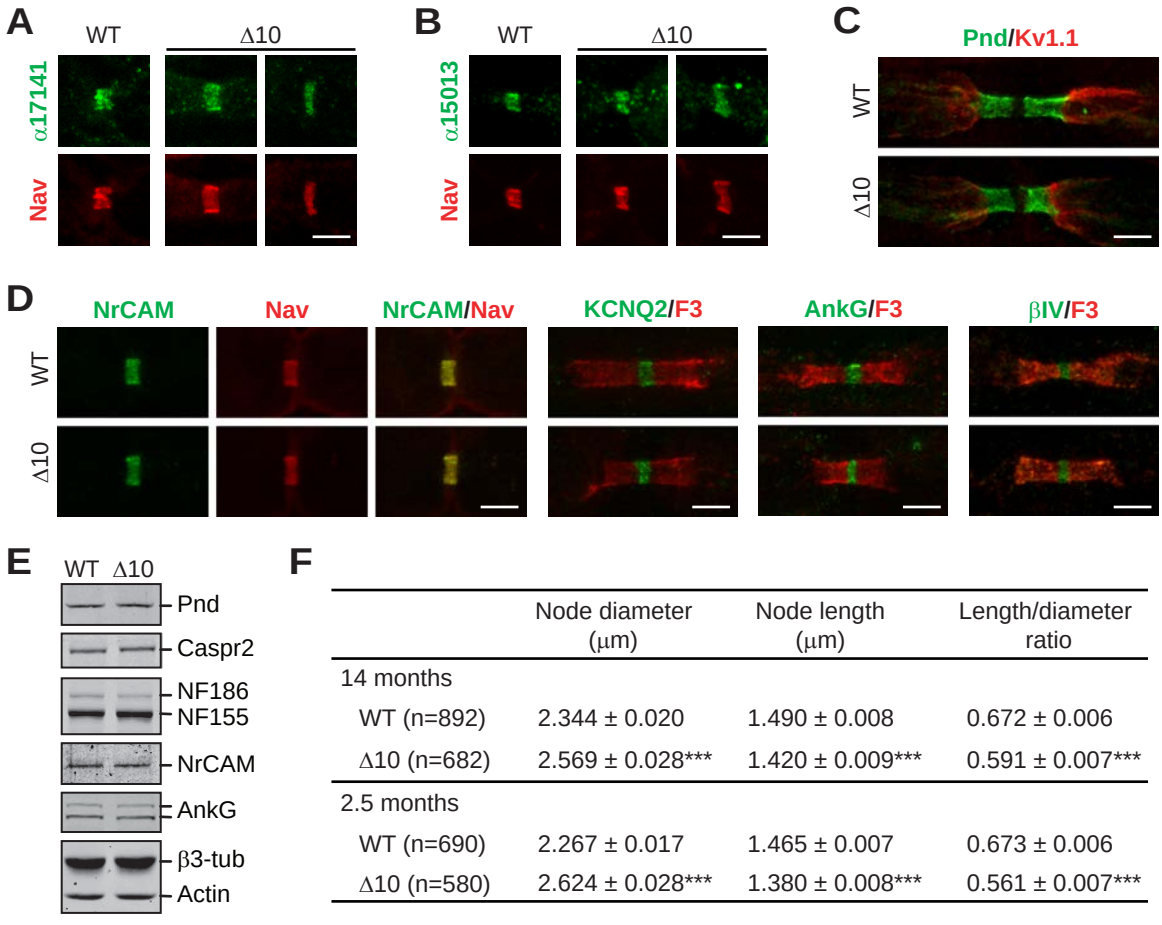

A
WT
Δ10
B
WT
Δ10
C
WT
Δ10
g-ratio
0.90
0.85
0.80
0.75
***
*
***
***
***
***
***
2
3
4
5
6
7
8
Axon diameter (μm)

Figure 4



F

	Node diameter (μm)	Node length (μm)	Length/diameter ratio
14 months			
WT (n=892)	2.344 ± 0.020	1.490 ± 0.008	0.672 ± 0.006
Δ10 (n=682)	2.569 ± 0.028***	1.420 ± 0.009***	0.591 ± 0.007***
2.5 months			
WT (n=690)	2.267 ± 0.017	1.465 ± 0.007	0.673 ± 0.006
Δ10 (n=580)	2.624 ± 0.028***	1.380 ± 0.008***	0.561 ± 0.007***

Figure 5

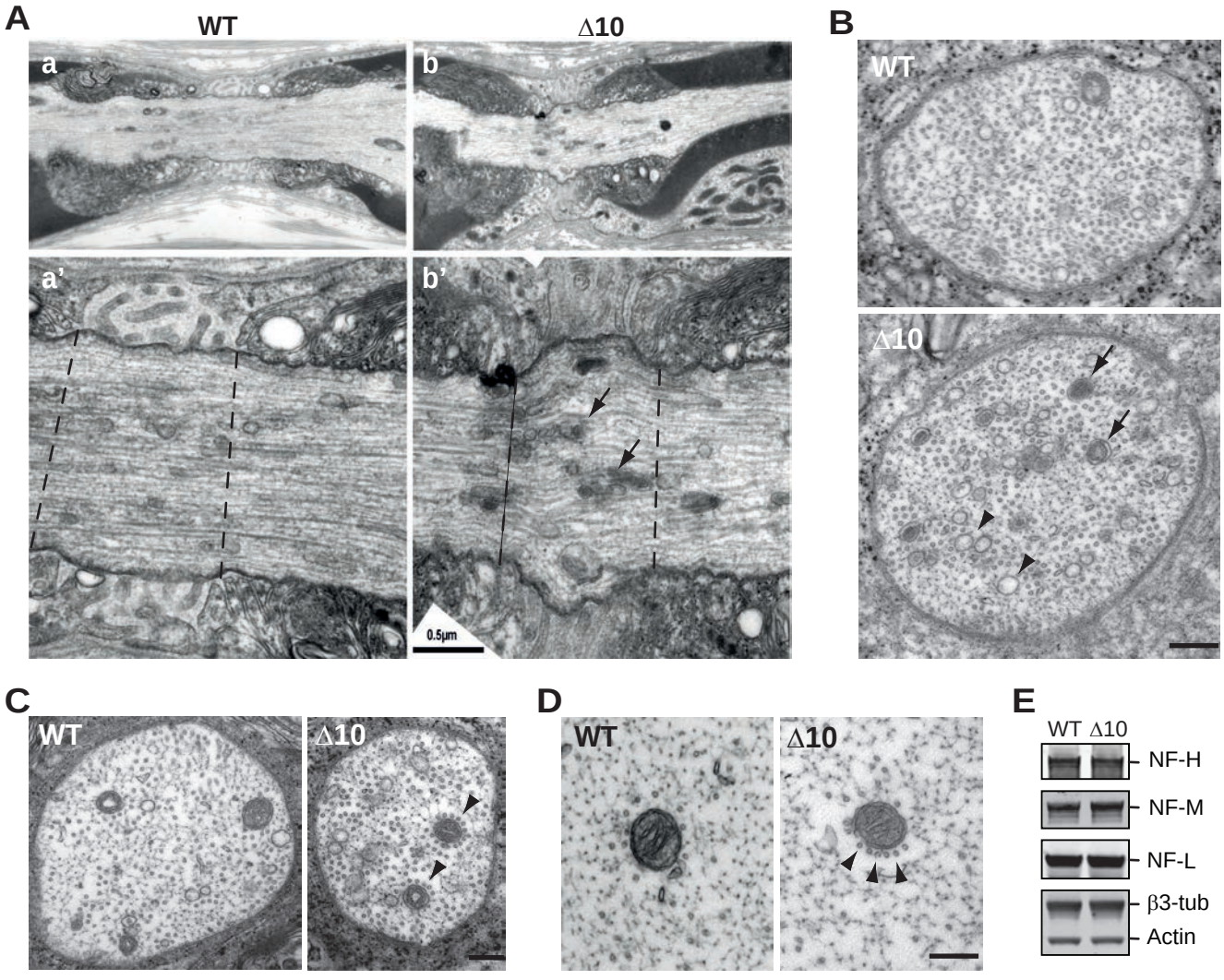

A
WT
Δ10
a
b
a'
b'
0.5μm
B
WT
Δ10
C
WT
Δ10
D
WT
Δ10
E
WT Δ10
NF-H
NF-M
NF-L
β3-tub
Actin

Figure 6

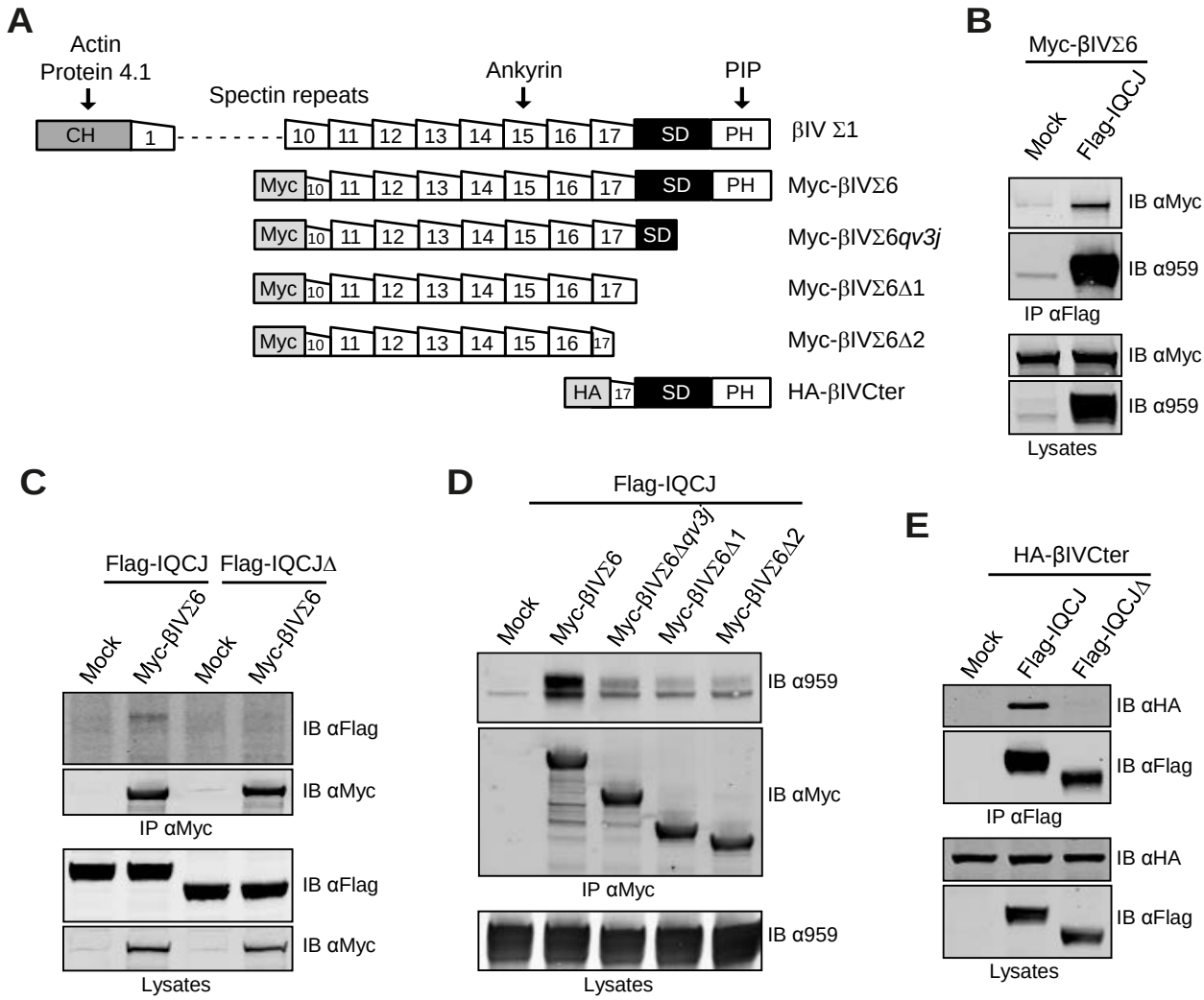

A
Actin
Protein 4.1
Spectrin repeats
Ankyrin
PIP
CH
1
10
11
12
13
14
15
16
17
SD
PH
βIV Σ1
Myc
Myc-βIVΣ6
Myc-βIVΣ6qv3j
Myc-βIVΣ6Δ1
Myc-βIVΣ6Δ2
HA
HA-βIVCter
B
Myc-βIVΣ6
Mock
Flag-IQCJ
IB αMyc
IB α959
IP αFlag
IB αMyc
IB α959
Lysates
C
Flag-IQCJ
Flag-IQCJΔ
Mock
Myc-βIVΣ6
Mock
Myc-βIVΣ6
IB αFlag
IB αMyc
IP αMyc
IB αFlag
IB αMyc
Lysates
D
Flag-IQCJ
Mock
Myc-βIVΣ6
Myc-βIVΣ6Δqv3j
Myc-βIVΣ6Δ1
Myc-βIVΣ6Δ2
IB α959
IB αMyc
IP αMyc
IB α959
Lysates
E
HA-βIVCter
Mock
Flag-IQCJ
Flag-IQCJΔ
IB αHA
IB αFlag
IP αFlag
IB αHA
IB αFlag
Lysates

Figure 7

II. ARTICLE 2

Le CO2, stimulus trigéminal inodore, induit une réponse dans le cortex olfactif.

Le CO_2, stimulus trigéminal inodore, induit une réponse dans le cortex olfactif

Odorless Trigeminal Stimulus CO_2 Triggers Response in the Olfactory Cortex

Quentin Chevy*, **Esther Klingler***

***** Contribution égale

- The Journal of Neuroscience, January 8, 2014 • 34(2):341–342 • 341 -

Revue de l'article : Carlson et al., 2013

Encoding and Representation of Intranasal CO2 in the Mouse Olfactory Cortex

Les résultats obtenus au cours de ma thèse m'ont amenée à m'intéresser à la fonction du cortex piriforme, structure du cortex olfactif connue pour participer à la perception, à l'association et à l'apprentissage des odeurs. L'encodage et l'intégration de l'information odorante au sein du cortex piriforme restent peu compris à ce jour. Les stimulations trigéminales sont connues pour moduler la perception des odeurs et des terminaisons trigéminales ont été observées dans le cortex olfactif (Cain and Murphy, 1980 ; Brand et al., 2007).

De manière intéressante, l'article de Carlson et collaborateurs (2013) apporte les premières preuves électrophysiologiques montrant que le CO_2, un stimulus trigéminal, peut activer les neurones du cortex piriforme. La réponse des neurones du cortex piriforme au CO_2 est spécifique : alors qu'une réponse à une molécule odorante est enregistrée pendant la présentation du stimulus, la réponse au CO_2 n'apparaît qu'après la présentation du stimulus.

Quentin Chevy, en thèse dans l'équipe de Jean-Christophe Poncer à l'institut du Fer à Moulin, étudie le rôle de KCC2 les mécanismes de plasticité au niveau de l'hippocampe, grâce à des techniques d'électrophysiologie et d'imagerie. Nous avons donc combiné son expertise en électrophysiologie et mon intérêt pour le cortex piriforme pour écrire une revue de l'article Carlson et al., 2013, publiée comme *Journal Club* dans *The Journal of Neuroscience*.

Journal Club

Editor's Note: These short, critical reviews of recent papers in the *Journal*, written exclusively by graduate students or postdoctoral fellows, are intended to summarize the important findings of the paper and provide additional insight and commentary. For more information on the format and purpose of the Journal Club, please see http://www.jneurosci.org/misc/ifa_features.shtml.

Odorless Trigeminal Stimulus CO_2 Triggers Response in the Olfactory Cortex

Quentin Chevy* and Esther Klingler*
Institut du Fer à Moulin UMR-S839 (INSERM/UPMC), 75005, Paris, France
Review of Carlson et al.

The olfactory cortex is separated from the outside world by only two synapses, without any relay and filter in the thalamus. The piriform cortex (PCX), part of the olfactory cortex, has been shown to play a role in odor perception, as well as in odor association and learning (Wilson and Sullivan, 2011). Nevertheless, little is known about how olfactory signals coming from the olfactory bulb (OB) are integrated in the olfactory cortex.

The PCX is composed of three layers and can be divided into two regions: the anterior PCX receives more afferents from the OB and has fewer association fibers than the posterior PCX (Bekkers and Suzuki, 2013). The anterior PCX receives not only olfactory signals, but also input from trigeminal nerve (Brand, 2006), which conveys mechanical, thermal, chemical, and/or nociceptive information. At high concentrations, most odorants can elicit intranasal sensations of burning, tingling, or pickling (Doty et al., 1978). Moreover, the odorless trigeminal stimulant, carbon dioxide (CO^2), when presented with low concentration odors, can increase pungency ratings of the odors (Cain and Murphy, 1980). In addition, imaging techniques in humans have shown that even pure trigeminal stimulants, such as CO_2, evoke activity in the PCX (Albrecht et al., 2010). There therefore appears to be interplay between the olfactory and trigeminal systems (Brand, 2006): non-olfactory trigeminal sensations may converge with odor information in the PCX and this convergence may influence odor perception.

In a recent study, Carlson et al. (2013) used multi- and single-unit *in vivo* electrophysiological recordings from anesthetized mice to study integration of olfactory and trigeminal stimulations in the anterior PCX. They compared the activity elicited by odor (low concentration of isopentyl acetate) to that elicited by trigeminal stimuli (CO_2). Low odor concentrations failed to evoke trigeminal sensation and therefore allowed the authors to study responses to olfactory stimuli independently. High odor concentration (4 Torr) or CO_2 allowed them to selectively study responses to trigeminal stimuli.

The authors showed that the activity of 26.3% of recorded PCX neurons was modulated by presentation of CO_2 alone. One-third of these neurons were also activated by odors. Among the neurons responding to isopentyl acetate (11.8% of all neurons), a substantial proportion was also sensitive to CO_2 stimulation (9.2% of all neurons). CO_2-evoked activity was not found in the whole olfactory cortex, however. For example, in the olfactory tubercle (another region of the olfactory cortex), activity in only 3.5% of recorded neurons was modulated by CO_2 presentation. Convergence of inputs to the PCX might explain how the presentation of CO_2 together with a low-concentration odor can change the pungency ratings of the odor.

Carlson et al. (2013) also found that the temporal dynamics of activation in PCX neurons was different for trigeminal versus odor stimulation. Whereas odors triggered an increase in the firing rate during stimulus presentation, the response to trigeminal stimulation occurred at stimulation offset, reaching peak of magnitude ~1 s after the stimulus, independent of CO_2 concentration or stimulus duration.

Carlson et al. (2013) next took advantage of the population of neurons responding with specific temporal dynamics to both odor and trigeminal stimulations to study the ability of odor to elicit intranasal trigeminal sensations. While recording PCX neurons exhibiting both odor and trigeminal-related activity, they applied different concentrations of odor (1–4 Torr of isopentyl acetate) or CO_2 (25–100%). Interestingly, at 4 Torr odor concentration, numerous single units displayed an offset response as found when CO_2 was presented. The authors concluded that the offset response could be generalized to different trigeminal stimuli. More interestingly, these results are the first electrophysiological evidence for a switch from odorant to trigeminal sensation when odors are presented at high concentrations.

While the experiments by Carlson et al. (2013) provided new insights into the temporal and spatial integration of odorant and trigeminal stimulation by the olfactory cortex, they also raise questions regarding the underlying network and the biological relevance of an offset activation

Received Oct. 19, 2013; revised Nov. 16, 2013; accepted Nov. 25, 2013.
The authors declare no competing financial interests.
*Q.C. and E.K. contributed equally to this work.
Correspondence should be addressed to Esther Klingler, Institut du Fer à Moulin UMR-S839 (INSERM/UPMC), 17 rue du Fer à Moulin, 75005 Paris, France. E-mail: esther.klingler@inserm.fr.
DOI:10.1523/JNEUROSCI.4466-13.2014
Copyright © 2014 the authors 0270-6474/14/340341-02$15.00/0

by trigeminal stimulant. Until now, few studies described the electrophysiological activation of the PCX following odor presentation (Bekkers and Suzuki, 2013). It is known that responses in the anterior PCX consist of a burst of activity time-locked to the onset of odor inhalation. Among others, Miura et al. (2012) showed that the activation of the PCX is more strongly correlated to inhalation than to the onset of odor presentation. Strikingly, in some cases, the offset response to trigeminal stimulus seemed also to be synchronized with the inhalation phase of respiration when the stimulus was no longer present (Carlson et al., 2013, their Fig. 3*A*). Whereas the authors showed that CO_2 presentation did not alter respiratory frequency, it would be interesting to study more deeply the putative correlation between trigeminally evoked activity and inhalation.

The response of some PCX neurons to both odor and trigeminal stimuli led Carlson et al. (2013) to propose that the modified pungency rating of odors by CO_2 may be explained by integration processes in the PCX. This interpretation is possible, but it is important to note that the related network is still poorly understood. Trigeminal ganglion neurons are unique among primary sensory neurons in having two axonal branches entering the CNS at widely distant points. The trigeminal nerve projects to the trigeminal nuclei, which in turn project to the amygdala and the thalamus, but some trigeminal collaterals also directly project to the olfactory epithelium (nasal cavity) and to the OB (Brand, 2006). Both these pathways should be activated by CO_2 presentation, and which contributes to activity induced in the PCX by CO_2 and high odor concentration remains unclear. Because the OB receives both direct input from odor sensory neurons and trigeminal input, integration could occur at the OB level, upstream of PCX. It would therefore be valuable to record the response of mitral cells in the OB to trigeminal stimulation.

As discussed above, the trigeminally evoked activity in PCX neurons is an offset response. The physiological relevance and cellular mechanisms underlying this offset response in the PCX remain to be investigated. These may be similar to those proposed to explain the offset response in other sensory systems, including the visual (Bair et al., 2002) and auditory (Kasai et al., 2012) systems. In the case of the auditory system, offset neurons of the inferior colliculus are thought to encode sound duration and the offset response has been proposed to result from postinhibitory rebound excitation dependent on intrinsic membrane properties (Kasai et al., 2012). Further studies using patch-clamp recording of PCX neurons would be necessary to determine whether postinhibitory rebound underlies the offset response in PCX. Moreover, the analyses performed by Carlson et al. (2013) and the low spontaneous activity of PCX neurons did not allow them to detect a putative inhibition during the stimulus that might trigger the offset responses. A more audacious hypothesis is that the low activity in PCX neurons observed upon the presentation of a high odor concentration resulted from an inhibitory activity related to the trigeminal component of the stimulation. From the different electrophysiological recording traces shown by Carlson et al. (2013), one may wonder if we are facing a homogeneous population of neurons. Kasai and colleagues (2012) showed that offset neurons in the auditory system represent a heterogeneous population: some of them were described as pure "offset" neurons (as found in Fig. 3*A*, middle, in Carlson et al., 2013), whereas others displayed both onset and offset activation (as found in Fig. 5*B* in Carlson et al., 2013). Among this last group, Kasai et al. (2012) observed two discharge patterns during the onset period: neurons displayed either a sustained or a phasic activity. It would therefore be of interest to more thoroughly investigate the offset patterns of neurons activated by trigeminal stimulation in the PCX.

In conclusion, Carlson et al. (2013) showed electrophysiological evidence for activation of neurons from the piriform cortex by an odorless trigeminal stimulant. Moreover, they described the pattern of activation of piriform cortex neurons upon this stimulation. Strikingly, whereas response to odor occurred during odor presentation, response to trigeminal stimulants appeared after the stimulus presentation, in the offset period. Importantly, this study gives strong new insights into the modulation of odor perception by trigeminal stimulants and highlights the particular role of the piriform cortex in multisensory integration of information.

References

Albrecht J, Kopietz R, Frasnelli J, Wiesmann M, Hummel T, Lundström JN (2010) The neuronal correlates of intranasal trigeminal function-an ALE meta-analysis of human functional brain imaging data. Brain Res Rev 62:183–196. CrossRef Medline

Bair W, Cavanaugh JR, Smith MA, Movshon JA (2002) The timing of response onset and offset in macaque visual neurons. J Neurosci 22:3189–3205. Medline

Bekkers JM, Suzuki N (2013) Neurons and circuits for odor processing in the piriform cortex. Trends Neurosci 36:429–438. CrossRef Medline

Brand G (2006) Olfactory/trigeminal interactions in nasal chemoreception. Neurosci Biobehav Rev 30:908–917. CrossRef Medline

Cain WS, Murphy CL (1980) Interaction between chemoreceptive modalities of odour and irritation. Nature 284:255–257. CrossRef Medline

Carlson KS, Xia CZ, Wesson DW (2013) Encoding and representation of intranasal CO2 in the mouse olfactory cortex. J Neurosci 33:13873–13881. CrossRef Medline

Doty RL, Brugger WE, Jurs PC, Orndorff MA, Snyder PJ, Lowry LD (1978) Intranasal trigeminal stimulation from odorous volatiles: psychometric responses from anosmic and normal humans. Physiol Behav 20:175–185. CrossRef Medline

Kasai M, Ono M, Ohmori H (2012) Distinct neural firing mechanisms to tonal stimuli offset in the inferior colliculus of mice in vivo. Neurosci Res 73:224–237. CrossRef Medline

Miura K, Mainen ZF, Uchida N (2012) Odor representations in olfactory cortex: distributed rate coding and decorrelated population activity. Neuron 74:1087–1098. CrossRef Medline

Wilson DA, Sullivan RM (2011) Cortical processing of odor objects. Neuron 72:506–519. CrossRef Medline

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A -

Aboitiz F, Montiel J, Morales D, Concha M (2002) Evolutionary divergence of the reptilian and the mammalian brains: considerations on connectivity and development. Brain Res Brain Res Rev 39:141-153.

Agius E, Sagot Y, Duprat AM, Cochard P (1996) Antibodies directed against the beta 1-integrin subunit and peptides containing the IKVAV sequence of laminin perturb neurite outgrowth of peripheral neurons on immature spinal cord substrata. Neuroscience 71:773-786.

Ahmed G, Shinmyo Y, Ohta K, Islam SM, Hossain M, Naser IB, Riyadh MA, Su Y, Zhang S, Tessier-Lavigne M, Tanaka H (2011) Draxin inhibits axonal outgrowth through the netrin receptor DCC. J Neurosci 31:14018-14023.

Akiyama H, Kamiguchi H (2010) Phosphatidylinositol 3-kinase facilitates microtubule-dependent membrane transport for neuronal growth cone guidance. J Biol Chem 285:41740-41748.

Alberts P, Rudge R, Irinopoulou T, Danglot L, Gauthier-Rouviere C, Galli T (2006) Cdc42 and actin control polarized expression of TI-VAMP vesicles to neuronal growth cones and their fusion with the plasma membrane. Mol Biol Cell 17:1194-1203.

Alberts P, Rudge R, Hinners I, Muzerelle A, Martinez-Arca S, Irinopoulou T, Marthiens V, Tooze S, Rathjen F, Gaspar P, Galli T (2003) Cross talk between tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein-mediated transport and L1-mediated adhesion. Mol Biol Cell 14:4207-4220.

Alfano C, Viola L, Heng JI, Pirozzi M, Clarkson M, Flore G, De Maio A, Schedl A, Guillemot F, Studer M (2011) COUP-TFI promotes radial migration and proper morphology of callosal projection neurons by repressing Rnd2 expression. Development 138:4685-4697.

Armentano M, Filosa A, Andolfi G, Studer M (2006) COUP-TFI is required for the formation of commissural projections in the forebrain by regulating axonal growth. Development 133:4151-4162.

Armstrong JN, Saganich MJ, Xu NJ, Henkemeyer M, Heinemann SF, Contractor A (2006) B-ephrin reverse signaling is required for NMDA-independent long-term potentiation of mossy fibers in the hippocampus. J Neurosci 26:3474-3481.

Auranen M, Varilo T, Alen R, Vanhala R, Ayers K, Kempas E, Ylisaukko-Oja T, Peltonen L, Jarvela I (2003) Evidence for allelic association on chromosome 3q25-27 in families with autism spectrum disorders originating from a subisolate of Finland. Mol Psychiatry 8:879-884.

- B -

Bahler M, Rhoads A (2002) Calmodulin signaling via the IQ motif. FEBS Lett 513:107-113.

Bai J, Ramos RL, Paramasivam M, Siddiqi F, Ackman JB, LoTurco JJ (2008) The role of DCX and LIS1 in migration through the lateral cortical stream of developing forebrain. Dev Neurosci 30:144-156.

Banuelos S, Saraste M, Djinovic Carugo K (1998) Structural comparisons of calponin homology domains: implications for actin binding. Structure 6:1419-1431.

Bard L, Boscher C, Lambert M, Mege RM, Choquet D, Thoumine O (2008) A molecular clutch between the actin flow and N-cadherin adhesions drives growth cone migration. J Neurosci 28:5879-5890.

Barkai E, Bergman RE, Horwitz G, Hasselmo ME (1994) Modulation of associative memory function in a biophysical simulation of rat piriform cortex. J Neurophysiol 72:659-677.

Barnes AP, Polleux F (2009) Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. Annu Rev Neurosci 32:347-381.

Barnes AP, Lilley BN, Pan YA, Plummer LJ, Powell AW, Raines AN, Sanes JR, Polleux F (2007) LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons. Cell 129:549-563.

Barnes DC, Wilson DA (2014) Sleep and olfactory cortical plasticity. Front Behav Neurosci 8:134.

Barres BA, Raff MC (1999) Axonal control of oligodendrocyte development. J Cell Biol 147:1123-1128.

Bashaw GJ, Klein R (2010) Signaling from axon guidance receptors. Cold Spring Harb Perspect Biol 2:a001941.

Bekkers JM, Suzuki N (2013) Neurons and circuits for odor processing in the piriform cortex. Trends Neurosci 36:429-438.

Bekku Y, Rauch U, Ninomiya Y, Oohashi T (2009) Brevican distinctively assembles extracellular components at the large diameter nodes of Ranvier in the CNS. J Neurochem 108:1266-1276.

Bennett V, Baines AJ (2001) Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. Physiol Rev 81:1353-1392.

Bennett V, Healy J (2009) Membrane domains based on ankyrin and spectrin associated with cell-cell interactions. Cold Spring Harb Perspect Biol 1:a003012.

Bertling E, Hotulainen P, Mattila PK, Matilainen T, Salminen M, Lappalainen P (2004) Cyclase-associated protein 1 (CAP1) promotes cofilin-induced actin dynamics in mammalian nonmuscle cells. Mol Biol Cell 15:2324-2334.

Bhat MA, Rios JC, Lu Y, Garcia-Fresco GP, Ching W, St Martin M, Li J, Einheber S, Chesler M, Rosenbluth J, Salzer JL, Bellen HJ (2001) Axon-glia interactions and the domain organization of myelinated axons requires neurexin IV/Caspr/Paranodin. Neuron 30:369-383.

Bielle F, Griveau A, Narboux-Neme N, Vigneau S, Sigrist M, Arber S, Wassef M, Pierani A (2005) Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. Nat Neurosci 8:1002-1012.

Blackmore M, Letourneau PC (2006) L1, beta1 integrin, and cadherins mediate axonal regeneration in the embryonic spinal cord. J Neurobiol 66:1564-1583.

Blanchart A, De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L (2006) Time frame of mitral cell development in the mice olfactory bulb. J Comp Neurol 496:529-543.

Boiko T, Rasband MN, Levinson SR, Caldwell JH, Mandel G, Trimmer JS, Matthews G (2001) Compact myelin dictates the differential targeting of two sodium channel isoforms in the same axon. Neuron 30:91-104.

Bonanomi D, Fornasiero EF, Valdez G, Halegoua S, Benfenati F, Menegon A, Valtorta F (2008) Identification of a developmentally regulated pathway of membrane retrieval in neuronal growth cones. J Cell Sci 121:3757-3769.

Bonora E et al. (2005) Mutation screening and association analysis of six candidate genes for autism on chromosome 7q. Eur J Hum Genet 13:198-207.

Boyle ME, Berglund EO, Murai KK, Weber L, Peles E, Ranscht B (2001) Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve. Neuron 30:385-397.

Bradke F, Dotti CG (1997) Neuronal polarity: vectorial cytoplasmic flow precedes axon formation. Neuron 19:1175-1186.

Brault E, Gautreau A, Lamarine M, Callebaut I, Thomas G, Goutebroze L (2001) Normal membrane localization and actin association of the NF2 tumor suppressor protein are dependent on folding of its N-terminal domain. J Cell Sci 114:1901-1912.

Brechet A, Fache MP, Brachet A, Ferracci G, Baude A, Irondelle M, Pereira S, Leterrier C, Dargent B (2008) Protein kinase CK2 contributes to the organization of sodium channels in axonal membranes by regulating their interactions with ankyrin G. J Cell Biol 183:1101-1114.

Bretscher A, Edwards K, Fehon RG (2002) ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. Nat Rev Mol Cell Biol 3:586-599.

Bretscher A, Chambers D, Nguyen R, Reczek D (2000) ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. Annu Rev Cell Dev Biol 16:113-143.

Briancon-Marjollet A, Ghogha A, Nawabi H, Triki I, Auziol C, Fromont S, Piche C, Enslen H, Chebli K, Cloutier JF, Castellani V, Debant A, Lamarche-Vane N (2008) Trio mediates netrin-1-induced Rac1 activation in axon outgrowth and guidance. Mol Cell Biol 28:2314-2323.

Brose K, Tessier-Lavigne M (2000) Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration. Curr Opin Neurobiol 10:95-102.

Brunjes PC, Illig KR, Meyer EA (2005) A field guide to the anterior olfactory nucleus (cortex). Brain Res Brain Res Rev 50:305-335.

Butler SJ, Dodd J (2003) A role for BMP heterodimers in roof plate-mediated repulsion of commissural axons. Neuron 38:389-401.

Buttermore ED, Dupree JL, Cheng J, An X, Tessarollo L, Bhat MA (2011) The cytoskeletal adaptor protein band 4.1B is required for the maintenance of paranodal axoglial septate junctions in myelinated axons. J Neurosci 31:8013-8024.

- C -

Caldwell JH, Schaller KL, Lasher RS, Peles E, Levinson SR (2000) Sodium channel Na(v)1.6 is localized at nodes of ranvier, dendrites, and synapses. Proc Natl Acad Sci U S A 97:5616-5620.

Campbell DS, Holt CE (2001) Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. Neuron 32:1013-1026.

Campbell DS, Holt CE (2003) Apoptotic pathway and MAPKs differentially regulate chemotropic responses of retinal growth cones. Neuron 37:939-952.

Cang J, Isaacson JS (2003) In vivo whole-cell recording of odor-evoked synaptic transmission in the rat olfactory bulb. J Neurosci 23:4108-4116.

Carlson KS, Xia CZ, Wesson DW (2013) Encoding and representation of intranasal CO2 in the mouse olfactory cortex. JNeurosci 33:13873-13881.

Carney RS, Alfonso TB, Cohen D, Dai H, Nery S, Stoica B, Slotkin J, Bregman BS, Fishell G, Corbin JG (2006) Cell migration along the lateral cortical stream to the developing basal telencephalic limbic system. J Neurosci 26:11562-11574.

Castellani V, Falk J, Rougon G (2004) Semaphorin3A-induced receptor endocytosis during axon guidance responses is mediated by L1 CAM. Mol Cell Neurosci 26:89-100.

Castellani V, Chedotal A, Schachner M, Faivre-Sarrailh C, Rougon G (2000) Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. Neuron 27:237-249.

Catterall WA (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. Neuron 26:13-25.

Chan CE, Odde DJ (2008) Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. Science 322:1687-1691.

Chan W, Kordeli E, Bennett V (1993) 440-kD ankyrinB: structure of the major developmentally regulated domain and selective localization in unmyelinated axons. J Cell Biol 123:1463-1473.

Chang L, Jones Y, Ellisman MH, Goldstein LS, Karin M (2003) JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. Dev Cell 4:521-533.

Charles P, Tait S, Faivre-Sarrailh C, Barbin G, Gunn-Moore F, Denisenko-Nehrbass N, Guennoc AM, Girault JA, Brophy PJ, Lubetzki C (2002) Neurofascin is a glial receptor for the paranodin/Caspr-contactin axonal complex at the axoglial junction. Curr Biol 12:217-220.

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

Chen H, Bagri A, Zupicich JA, Zou Y, Stoeckli E, Pleasure SJ, Lowenstein DH, Skarnes WC, Chedotal A, Tessier-Lavigne M (2000) Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. Neuron 25:43-56.

Chen Q, Chen TJ, Letourneau PC, Costa Lda F, Schubert D (2005) Modifier of cell adhesion regulates N-cadherin-mediated cell-cell adhesion and neurite outgrowth. J Neurosci 25:281-290.

Cheng A, Hou Y, Mattson MP (2010) Mitochondria and neuroplasticity. ASN Neuro 2:e00045.

Cheng L, Lemmon V (2004) Pathological missense mutations of neural cell adhesion molecule L1 affect neurite outgrowth and branching on an L1 substrate. Mol Cell Neurosci 27:522-530.

Cheng L, Itoh K, Lemmon V (2005) L1-mediated branching is regulated by two ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding sites, the RSLE region and a novel juxtamembrane ERM-binding region. J Neurosci 25:395-403.

Chernyshova Y, Leshchyns'ka I, Hsu SC, Schachner M, Sytnyk V (2011) The neural cell adhesion molecule promotes FGFR-dependent phosphorylation and membrane targeting of the exocyst complex to induce exocytosis in growth cones. J Neurosci 31:3522-3535.

Cho IH, Lee KW, Ha HY, Han PL (2011) JNK/stress-activated protein kinase associated protein 1 is required for early development of telencephalic commissures in embryonic brains. Exp Mol Med 43:462-470.

Choi GB, Stettler DD, Kallman BR, Bhaskar ST, Fleischmann A, Axel R (2011) Driving opposing behaviors with ensembles of piriform neurons. Cell 146:1004-1015.

Cifuentes-Diaz C, Chareyre F, Garcia M, Devaux J, Carnaud M, Levasseur G, Niwa-Kawakita M, Harroch S, Girault JA, Giovannini M, Goutebroze L (2011) Protein 4.1B contributes to the organization of peripheral myelinated axons. PLoS One 6:e25043.

Cleland TA (2010) Early transformations in odor representation. Trends Neurosci 33:130-139.

Colamarino SA, Tessier-Lavigne M (1995) The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. Cell 81:621-629.

Colicelli J (2004) Human RAS superfamily proteins and related GTPases. Sci STKE 2004:RE13.

Cooper EC (2011) Made for "anchorin": Kv7.2/7.3 (KCNQ2/KCNQ3) channels and the modulation of neuronal excitability in vertebrate axons. Semin Cell Dev Biol 22:185-192.

Cooper J, Giancotti FG (2014) Molecular insights into NF2/Merlin tumor suppressor function. FEBS Lett.

Corbin JG, Nery S, Fishell G (2001) Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain. Nat Neurosci 4 Suppl:1177-1182.

Cowan CA, Henkemeyer M (2001) The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. Nature 413:174-179.

Cowan CA, Yokoyama N, Saxena A, Chumley MJ, Silvany RE, Baker LA, Srivastava D, Henkemeyer M (2004) Ephrin-B2 reverse signaling is required for axon pathfinding and cardiac valve formation but not early vascular development. Dev Biol 271:263-271.

Culotti JG, Kolodkin AL (1996) Functions of netrins and semaphorins in axon guidance. Curr Opin Neurobiol 6:81-88.

Cummings DM, Malun D, Brunjes PC (1997) Development of the anterior commissure in the opossum: midline extracellular space and glia coincide with early axon decussation. J Neurobiol 32:403-414.

Custer AW, Kazarinova-Noyes K, Sakurai T, Xu X, Simon W, Grumet M, Shrager P (2003) The role of the ankyrin-binding protein NrCAM in node of Ranvier formation. J Neurosci 23:10032-10039.

- D -

D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. Nature 374:719-723.

Davis J, Bennett V (1983) Brain spectrin. Isolation of subunits and formation of hybrids with erythrocyte spectrin subunits. J Biol Chem 258:7757-7766.

Davis JQ, Lambert S, Bennett V (1996) Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments. J Cell Biol 135:1355-1367.

Davison IG, Ehlers MD (2011) Neural circuit mechanisms for pattern detection and feature combination in olfactory cortex. Neuron 70:82-94.

De Carlos JA, O'Leary DD (1992) Growth and targeting of subplate axons and establishment of major cortical pathways. J Neurosci 12:1194-1211.

De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Valverde F (1996) Early olfactory fiber projections and cell migration into the rat telencephalon. Int J Dev Neurosci 14:853-866.

de Castro F (2009) Wiring Olfaction: The Cellular and Molecular Mechanisms that Guide the Development of Synaptic Connections from the Nose to the Cortex. Front Neurosci 3:52.

Dehmelt L, Halpain S (2004) Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? J Neurobiol 58:18-33.

Denisenko-Nehrbass N, Goutebroze L, Galvez T, Bonnon C, Stankoff B, Ezan P, Giovannini M, Faivre-Sarrailh C, Girault JA (2003) Association of Caspr/paranodin with tumour suppressor schwannomin/merlin and beta1 integrin in the central nervous system. J Neurochem 84:209-221.

Dennis EL, Thompson PM (2013) Typical and atypical brain development: a review of neuroimaging studies. Dialogues Clin Neurosci 15:359-384.

Dent EW, Meiri KF (1998) Distribution of phosphorylated GAP-43 (neuromodulin) in growth cones directly reflects growth cone behavior. J Neurobiol 35:287-299.

Dent EW, Kalil K (2001) Axon branching requires interactions between dynamic microtubules and actin filaments. J Neurosci 21:9757-9769.

Dent EW, Gertler FB (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. Neuron 40:209-227.

Dequidt C, Danglot L, Alberts P, Galli T, Choquet D, Thoumine O (2007) Fast turnover of L1 adhesions in neuronal growth cones involving both surface diffusion and exo/endocytosis of L1 molecules. Mol Biol Cell 18:3131-3143.

Devaux J, Alcaraz G, Grinspan J, Bennett V, Joho R, Crest M, Scherer SS (2003) Kv3.1b is a novel component of CNS nodes. J Neurosci 23:4509-4518.

Devaux JJ (2010) The C-terminal domain of ssIV-spectrin is crucial for KCNQ2 aggregation and excitability at nodes of Ranvier. J Physiol 588:4719-4730.

Devaux JJ, Kleopa KA, Cooper EC, Scherer SS (2004) KCNQ2 is a nodal K+ channel. J Neurosci 24:1236-1244.

DiCicco-Bloom E, Lord C, Zwaigenbaum L, Courchesne E, Dager SR, Schmitz C, Schultz RT, Crawley J, Young LJ (2006) The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. J Neurosci 26:6897-6906.

Dickson BJ (2001) Rho GTPases in growth cone guidance. Curr Opin Neurobiol 11:103-110.

Dickson TC, Mintz CD, Benson DL, Salton SR (2002) Functional binding interaction identified between the axonal CAM L1 and members of the ERM family. J Cell Biol 157:1105-1112.

Diefenbach TJ, Guthrie PB, Stier H, Billups B, Kater SB (1999) Membrane recycling in the neuronal growth cone revealed by FM1-43 labeling. J Neurosci 19:9436-9444.

Diestel S, Schaefer D, Cremer H, Schmitz B (2007) NCAM is ubiquitylated, endocytosed and recycled in neurons. J Cell Sci 120:4035-4049.

Disanza A, Frittoli E, Palamidessi A, Scita G (2009) Endocytosis and spatial restriction of cell signaling. Mol Oncol 3:280-296.

Dottori M, Hartley L, Galea M, Paxinos G, Polizzotto M, Kilpatrick T, Bartlett PF, Murphy M, Kontgen F, Boyd AW (1998) EphA4 (Sek1) receptor tyrosine kinase is required for the development of the corticospinal tract. Proc Natl Acad Sci U S A 95:13248-13253.

Doucette W, Gire DH, Whitesell J, Carmean V, Lucero MT, Restrepo D (2011) Associative cortex features in the first olfactory brain relay station. Neuron 69:1176-1187.

Dravis C, Yokoyama N, Chumley MJ, Cowan CA, Silvany RE, Shay J, Baker LA, Henkemeyer M (2004) Bidirectional signaling mediated by ephrin-B2 and EphB2 controls urorectal development. Dev Biol 271:272-290.

Dzhashiashvili Y, Zhang Y, Galinska J, Lam I, Grumet M, Salzer JL (2007) Nodes of Ranvier and axon initial segments are ankyrin G-dependent domains that assemble by distinct mechanisms. J Cell Biol 177:857-870.

- E -

Ebert DH, Greenberg ME (2013) Activity-dependent neuronal signalling and autism spectrum disorder. Nature 493:327-337.

Egea J, Klein R (2007) Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance. Trends Cell Biol 17:230-238.

Einheber S, Meng X, Rubin M, Lam I, Mohandas N, An X, Shrager P, Kissil J, Maurel P, Salzer JL (2013) The 4.1B cytoskeletal protein regulates the domain organization and sheath thickness of myelinated axons. Glia 61:240-253.

Engelhardt M, Vorwald S, Sobotzik JM, Bennett V, Schultz C (2013) Ankyrin-B structurally defines terminal microdomains of peripheral somatosensory axons. Brain Struct Funct 218:1005-1016.

Eshed Y, Feinberg K, Carey DJ, Peles E (2007) Secreted gliomedin is a perinodal matrix component of peripheral nerves. J Cell Biol 177:551-562.

Eshed Y, Feinberg K, Poliak S, Sabanay H, Sarig-Nadir O, Spiegel I, Bermingham JR, Jr., Peles E (2005) Gliomedin mediates Schwann cell-axon interaction and the molecular assembly of the nodes of Ranvier. Neuron 47:215-229.

Eva R, Dassie E, Caswell PT, Dick G, ffrench-Constant C, Norman JC, Fawcett JW (2010) Rab11 and its effector Rab coupling protein contribute to the trafficking of beta 1 integrins during axon growth in adult dorsal root ganglion neurons and PC12 cells. J Neurosci 30:11654-11669.

Evans DG, Huson SM, Donnai D, Neary W, Blair V, Newton V, Harris R (1992) A clinical study of type 2 neurofibromatosis. Q J Med 84:603-618.

- F -

Faivre-Sarrailh C, Falk J, Pollerberg E, Schachner M, Rougon G (1999) NrCAM, cerebellar granule cell receptor for the neuronal adhesion molecule F3, displays and actin-dependent mobility in growth cones. J Cell Sci 112:3015-3027.

Faivre-Sarrailh C, Devaux JJ (2013) Neuro-glial interactions at the nodes of Ranvier: implication in health and diseases. Front Cell Neurosci 7:196.

Falk J, Thoumine O, Dequidt C, Choquet D, Faivre-Sarrailh C (2004) NrCAM coupling to the cytoskeleton depends on multiple protein domains and partitioning into lipid rafts. Mol Biol Cell 15:4695-4709.

Falk J, Bechara A, Fiore R, Nawabi H, Zhou H, Hoyo-Becerra C, Bozon M, Rougon G, Grumet M, Puschel AW, Sanes JR, Castellani V (2005) Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. Neuron 48:63-75.

Fawcett JP, Georgiou J, Ruston J, Bladt F, Sherman A, Warner N, Saab BJ, Scott R, Roder JC, Pawson T (2007) Nck adaptor proteins control the organization of neuronal circuits important for walking. Proc Natl Acad Sci U S A 104:20973-20978.

Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, Stoeckli ET, Keino-Masu K, Masu M, Rayburn H, Simons J, Bronson RT, Gordon JI, Tessier-Lavigne M, Weinberg RA (1997) Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. Nature 386:796-804.

Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A (2010) Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. Nat Rev Mol Cell Biol 11:276-287.

Feinberg K, Eshed-Eisenbach Y, Frechter S, Amor V, Salomon D, Sabanay H, Dupree JL, Grumet M, Brophy PJ, Shrager P, Peles E (2010) A glial signal consisting of gliomedin and NrCAM clusters axonal Na+ channels during the formation of nodes of Ranvier. Neuron 65:490-502.

Fournier AE, Nakamura F, Kawamoto S, Goshima Y, Kalb RG, Strittmatter SM (2000) Semaphorin 3A enhances endocytosis at sites of receptor F-actin colocalization during growth cone collapse. J Cell Biol 149:411-422.

Franks KM, Isaacson JS (2005) Synapse-specific downregulation of NMDA receptors by early experience: a critical period for plasticity of sensory input to olfactory cortex. Neuron 47:101-114.

Fujita T, Ikuta J, Hamada J, Okajima T, Tatematsu K, Tanizawa K, Kuroda S (2004) Identification of a tissue-non-specific homologue of axonal fasciculation and elongation protein zeta-1. Biochem Biophys Res Commun 313:738-744.

Fujita T, Maturana AD, Ikuta J, Hamada J, Walchli S, Suzuki T, Sawa H, Wooten MW, Okajima T, Tatematsu K, Tanizawa K, Kuroda S (2007) Axonal guidance protein FEZ1 associates with tubulin and kinesin motor protein to transport mitochondria in neurites of NGF-stimulated PC12 cells. Biochem Biophys Res Commun 361:605-610.

- G -

Gale K (1992) Subcortical structures and pathways involved in convulsive seizure generation. J Clin Neurophysiol 9:264-277.

Galiano MR, Jha S, Ho TS, Zhang C, Ogawa Y, Chang KJ, Stankewich MC, Mohler PJ, Rasband MN (2012) A distal axonal cytoskeleton forms an intra-axonal boundary that controls axon initial segment assembly. Cell 149:1125-1139.

Garcia-Moreno F, Lopez-Mascaraque L, de Carlos JA (2008) Early telencephalic migration topographically converging in the olfactory cortex. Cereb Cortex 18:1239-1252.

Garrido JJ, Fernandes F, Moussif A, Fache MP, Giraud P, Dargent B (2003) Dynamic compartmentalization of the voltage-gated sodium channels in axons. Biol Cell 95:437-445.

Garver TD, Ren Q, Tuvia S, Bennett V (1997) Tyrosine phosphorylation at a site highly conserved in the L1 family of cell adhesion molecules abolishes ankyrin binding and increases lateral mobility of neurofascin. J Cell Biol 137:703-714.

Georgakopoulos A, Litterst C, Ghersi E, Baki L, Xu C, Serban G, Robakis NK (2006) Metalloproteinase/Presenilin1 processing of ephrinB regulates EphB-induced Src phosphorylation and signaling. EMBO J 25:1242-1252.

George AL, Jr. (2005) Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. J Clin Invest 115:1990-1999.

Giannone G, Mege RM, Thoumine O (2009) Multi-level molecular clutches in motile cell processes. Trends Cell Biol 19:475-486.

Gibson AE, Noel RJ, Herlihy JT, Ward WF (1989) Phenylarsine oxide inhibition of endocytosis: effects on asialofetuin internalization. Am J Physiol 257:C182-184.

Giessel AJ, Datta SR (2014) Olfactory maps, circuits and computations. Curr Opin Neurobiol 24C:120-132.

Giger RJ, Cloutier JF, Sahay A, Prinjha RK, Levengood DV, Moore SE, Pickering S, Simmons D, Rastan S, Walsh FS, Kolodkin AL, Ginty DD, Geppert M (2000) Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. Neuron 25:29-41.

Gil OD, Sakurai T, Bradley AE, Fink MY, Cassella MR, Kuo JA, Felsenfeld DP (2003) Ankyrin binding mediates L1CAM interactions with static components of the cytoskeleton and inhibits retrograde movement of L1CAM on the cell surface. J Cell Biol 162:719-730.

Girault JA, Peles E (2002) Development of nodes of Ranvier. Curr Opin Neurobiol 12:476-485.

Girault JA, Labesse G, Mornon JP, Callebaut I (1998) Janus kinases and focal adhesion kinases play in the 4.1 band: a superfamily of band 4.1 domains important for cell structure and signal transduction. Mol Med 4:751-769.

Gonzalez-Agosti C, Solomon F (1996) Response of radixin to perturbations of growth cone morphology and motility in chick sympathetic neurons in vitro. Cell Motil Cytoskeleton 34:122-136.

Gordon-Weeks PR (2004) Microtubules and growth cone function. J Neurobiol 58:70-83.

Gottfried JA (2010) Central mechanisms of odour object perception. Nat Rev Neurosci 11:628-641.

Gottfried JA, Winston JS, Dolan RJ (2006) Dissociable codes of odor quality and odorant structure in human piriform cortex. Neuron 49:467-479.

Gottfried JA, Deichmann R, Winston JS, Dolan RJ (2002) Functional heterogeneity in human olfactory cortex: an event-related functional magnetic resonance imaging study. J Neurosci 22:10819-10828.

Goutebroze L, Der Sarkissian H, Brault E, Thomas G (2001) Assignment of the schwannomin-interacting protein 1 (SCHIP1) gene to human chromosome band 3q25 by in situ hybridization and with somatic cell hybrids. Cytogenet Cell Genet 94:96-97.

Goutebroze L, Brault E, Muchardt C, Camonis J, Thomas G (2000) Cloning and characterization of SCHIP-1, a novel protein interacting specifically with spliced isoforms and naturally occurring mutant NF2 proteins. Mol Cell Biol 20:1699-1712.

Govek EE, Newey SE, Van Aelst L (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. Genes Dev 19:1-49.

Grobe K, Inatani M, Pallerla SR, Castagnola J, Yamaguchi Y, Esko JD (2005) Cerebral hypoplasia and craniofacial defects in mice lacking heparan sulfate Ndst1 gene function. Development 132:3777-3786.

Gronholm M, Teesalu T, Tyynela J, Piltti K, Bohling T, Wartiovaara K, Vaheri A, Carpen O (2005) Characterization of the NF2 protein merlin and the ERM protein ezrin in human, rat, and mouse central nervous system. Mol Cell Neurosci 28:683-693.

- H -

Ha HY, Cho IH, Lee KW, Song JY, Kim KS, Yu YM, Lee JK, Song JS, Yang SD, Shin HS, Han PL (2005) The axon guidance defect of the telencephalic commissures of the JSAP1-deficient brain was partially rescued by the transgenic expression of JIP1. Dev Biol 277:184-199.

Haberly LB (2001) Parallel-distributed processing in olfactory cortex: new insights from morphological and physiological analysis of neuronal circuitry. Chem Senses 26:551-576.

Haberly LB, Bower JM (1989) Olfactory cortex: model circuit for study of associative memory? Trends Neurosci 12:258-264.

Hagiwara A, Pal SK, Sato TF, Wienisch M, Murthy VN (2012) Optophysiological analysis of associational circuits in the olfactory cortex. Front Neural Circuits 6:18.

Hall A, Lalli G (2010) Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching. Cold Spring Harb Perspect Biol 2:a001818.

Hasselmo ME, Barkai E (1995) Cholinergic modulation of activity-dependent synaptic plasticity in the piriform cortex and associative memory function in a network biophysical simulation. J Neurosci 15:6592-6604.

He Q, Dent EW, Meiri KF (1997) Modulation of actin filament behavior by GAP-43 (neuromodulin) is dependent on the phosphorylation status of serine 41, the protein kinase C site. J Neurosci 17:3515-3524.

Hedstrom KL, Xu X, Ogawa Y, Frischknecht R, Seidenbecher CI, Shrager P, Rasband MN (2007) Neurofascin assembles a specialized extracellular matrix at the axon initial segment. J Cell Biol 178:875-886.

Henkemeyer M, Orioli D, Henderson JT, Saxton TM, Roder J, Pawson T, Klein R (1996) Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. Cell 86:35-46.

Herron LR, Hill M, Davey F, Gunn-Moore FJ (2009) The intracellular interactions of the L1 family of cell adhesion molecules. Biochem J 419:519-531.

Hevner RF, Shi L, Justice N, Hsueh Y, Sheng M, Smiga S, Bulfone A, Goffinet AM, Campagnoni AT, Rubenstein JL (2001) Tbr1 regulates differentiation of the preplate and layer 6. Neuron 29:353-366.

Hill AS, Nishino A, Nakajo K, Zhang G, Fineman JR, Selzer ME, Okamura Y, Cooper EC (2008) Ion channel clustering at the axon initial segment and node of Ranvier evolved sequentially in early chordates. PLoS Genet 4:e1000317.

Hines JH, Abu-Rub M, Henley JR (2010) Asymmetric endocytosis and remodeling of beta1-integrin adhesions during growth cone chemorepulsion by MAG. Nat Neurosci 13:829-837.

Hines JH, Henle SJ, Carlstrom LP, Abu-Rub M, Henley JR (2012) Single vesicle imaging indicates distinct modes of rapid membrane retrieval during nerve growth. BMC Biol 10:4.

Hirao M, Sato N, Kondo T, Yonemura S, Monden M, Sasaki T, Takai Y, Tsukita S (1996) Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. J Cell Biol 135:37-51.

Hirata T, Fujisawa H (1999) Environmental control of collateral branching and target invasion of mitral cell axons during development. J Neurobiol 38:93-104.

Ho SK, Kovacevic N, Henkelman RM, Boyd A, Pawson T, Henderson JT (2009) EphB2 and EphA4 receptors regulate formation of the principal inter-hemispheric tracts of the mammalian forebrain. Neuroscience 160:784-795.

Horresh I, Bar V, Kissil JL, Peles E (2010) Organization of myelinated axons by Caspr and Caspr2 requires the cytoskeletal adapter protein 4.1B. J Neurosci 30:2480-2489.

Horresh I, Poliak S, Grant S, Bredt D, Rasband MN, Peles E (2008) Multiple molecular interactions determine the clustering of Caspr2 and Kv1 channels in myelinated axons. J Neurosci 28:14213-14222.

Hortsch M (2000) Structural and functional evolution of the L1 family: are four adhesion molecules better than one? Mol Cell Neurosci 15:1-10.

Hossain M, Ahmed G, Naser IB, Shinmyo Y, Ito A, Riyadh MA, Felemban A, Song X, Ohta K, Tanaka H (2013) The combinatorial guidance activities of draxin and Tsukushi are essential for forebrain commissure formation. Dev Biol 374:58-70.

Howard JD, Plailly J, Grueschow M, Haynes JD, Gottfried JA (2009) Odor quality coding and categorization in human posterior piriform cortex. Nat Neurosci 12:932-938.

Hu VW, Frank BC, Heine S, Lee NH, Quackenbush J (2006) Gene expression profiling of lymphoblastoid cell lines from monozygotic twins discordant in severity of autism reveals differential regulation of neurologically relevant genes. BMC Genomics 7:118.

Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. Annu Rev Neurosci 24:677-736.

Huang TN, Chuang HC, Chou WH, Chen CY, Wang HF, Chou SJ, Hsueh YP (2014) Tbr1 haploinsufficiency impairs amygdalar axonal projections and results in cognitive abnormality. Nat Neurosci 17:240-247.

Huber AB, Kolodkin AL, Ginty DD, Cloutier JF (2003) Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. Annu Rev Neurosci 26:509-563.

Hulsmeier J, Pielage J, Rickert C, Technau GM, Klambt C, Stork T (2007) Distinct functions of alpha-Spectrin and beta-Spectrin during axonal pathfinding. Development 134:713-722.

Huot J (2004) Ephrin signaling in axon guidance. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 28:813-818.

Hussman JP, Chung RH, Griswold AJ, Jaworski JM, Salyakina D, Ma D, Konidari I, Whitehead PL, Vance JM, Martin ER, Cuccaro ML, Gilbert JR, Haines JL, Pericak-Vance MA (2011) A noise-reduction GWAS analysis implicates altered regulation of neurite outgrowth and guidance in autism. Mol Autism 2:1.

- I -

Illig KR, Haberly LB (2003) Odor-evoked activity is spatially distributed in piriform cortex. J Comp Neurol 457:361-373.

Inaki K, Nishimura S, Nakashiba T, Itohara S, Yoshihara Y (2004) Laminar organization of the developing lateral olfactory tract revealed by differential expression of cell recognition molecules. J Comp Neurol 479:243-256.

Inatani M, Yamaguchi Y (2003) Gene expression of EXT1 and EXT2 during mouse brain development. Brain Res Dev Brain Res 141:129-136.

Inatani M, Irie F, Plump AS, Tessier-Lavigne M, Yamaguchi Y (2003) Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require heparan sulfate. Science 302:1044-1046.

Ipsaro JJ, Huang L, Mondragon A (2009) Structures of the spectrin-ankyrin interaction binding domains. Blood 113:5385-5393.

Islam SM, Shinmyo Y, Okafuji T, Su Y, Naser IB, Ahmed G, Zhang S, Chen S, Ohta K, Kiyonari H, Abe T, Tanaka S, Nishinakamura R, Terashima T, Kitamura T, Tanaka H (2009) Draxin, a repulsive guidance protein for spinal cord and forebrain commissures. Science 323:388-393.

Isom LL, Ragsdale DS, De Jongh KS, Westenbroek RE, Reber BF, Scheuer T, Catterall WA (1995) Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. Cell 83:433-442.

Ito A, Shinmyo Y, Abe T, Oshima N, Tanaka H, Ohta K (2010) Tsukushi is required for anterior commissure formation in mouse brain. Biochem Biophys Res Commun 402:813-818.

Ito K, Kawasaki T, Takashima S, Matsuda I, Aiba A, Hirata T (2008) Semaphorin 3F confines ventral tangential migration of lateral olfactory tract neurons onto the telencephalon surface. J Neurosci 28:4414-4422.

Itofusa R, Kamiguchi H (2011) Polarizing membrane dynamics and adhesion for growth cone navigation. Mol Cell Neurosci 48:332-338.

Iwata T, Hevner RF (2009) Fibroblast growth factor signaling in development of the cerebral cortex. Dev Growth Differ 51:299-323.

- J -

James MF, Manchanda N, Gonzalez-Agosti C, Hartwig JH, Ramesh V (2001) The neurofibromatosis 2 protein product merlin selectively binds F-actin but not G-actin, and stabilizes the filaments through a lateral association. Biochem J 356:377-386.

Janes PW, Saha N, Barton WA, Kolev MV, Wimmer-Kleikamp SH, Nievergall E, Blobel CP, Himanen JP, Lackmann M, Nikolov DB (2005) Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. Cell 123:291-304.

Jay DG (2000) The clutch hypothesis revisited: ascribing the roles of actin-associated proteins in filopodial protrusion in the nerve growth cone. J Neurobiol 44:114-125.

Jenkins SM, Bennett V (2001) Ankyrin-G coordinates assembly of the spectrin-based membrane skeleton, voltage-gated sodium channels, and L1 CAMs at Purkinje neuron initial segments. J Cell Biol 155:739-746.

Johnson DM, Illig KR, Behan M, Haberly LB (2000) New features of connectivity in piriform cortex visualized by intracellular injection of pyramidal cells suggest that "primary" olfactory cortex functions like "association" cortex in other sensory systems. J Neurosci 20:6974-6982.

Jones MC, Caswell PT, Norman JC (2006) Endocytic recycling pathways: emerging regulators of cell migration. Curr Opin Cell Biol 18:549-557.

Jurney WM, Gallo G, Letourneau PC, McLoon SC (2002) Rac1-mediated endocytosis during ephrin-A2- and semaphorin 3A-induced growth cone collapse. J Neurosci 22:6019-6028.

- K -

Kadohisa M, Wilson DA (2006) Separate encoding of identity and similarity of complex familiar odors in piriform cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 103:15206-15211.

Kalil K, Dent EW (2005) Touch and go: guidance cues signal to the growth cone cytoskeleton. Curr Opin Neurobiol 15:521-526.

Kamiguchi H, Lemmon V (2000a) Recycling of the cell adhesion molecule L1 in axonal growth cones. J Neurosci 20:3676-3686.

Kamiguchi H, Lemmon V (2000b) IgCAMs: bidirectional signals underlying neurite growth. Curr Opin Cell Biol 12:598-605.

Kamiguchi H, Yoshihara F (2001) The role of endocytic l1 trafficking in polarized adhesion and migration of nerve growth cones. J Neurosci 21:9194-9203.

Kamiguchi H, Long KE, Pendergast M, Schaefer AW, Rapoport I, Kirchhausen T, Lemmon V (1998) The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. J Neurosci 18:5311-5321.

Kang BS, Cooper DR, Devedjiev Y, Derewenda U, Derewenda ZS (2002) The structure of the FERM domain of merlin, the neurofibromatosis type 2 gene product. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 58:381-391.

Kassai H, Terashima T, Fukaya M, Nakao K, Sakahara M, Watanabe M, Aiba A (2008) Rac1 in cortical projection neurons is selectively required for midline crossing of commissural axonal formation. Eur J Neurosci 28:257-267.

Katsetos CD, Legido A, Perentes E, Mork SJ (2003) Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. J Child Neurol 18:851-866; discussion 867.

Kaufmann N, Wills ZP, Van Vactor D (1998) Drosophila Rac1 controls motor axon guidance. Development 125:453-461.

Kawasaki T, Ito K, Hirata T (2006) Netrin 1 regulates ventral tangential migration of guidepost neurons in the lateral olfactory tract. Development 133:845-853.

Kayser MS, McClelland AC, Hughes EG, Dalva MB (2006) Intracellular and trans-synaptic regulation of glutamatergic synaptogenesis by EphB receptors. J Neurosci 26:12152-12164.

Kelkar N, Gupta S, Dickens M, Davis RJ (2000) Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3. Mol Cell Biol 20:1030-1043.

Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M (1994) Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. Cell 78:425-435.

Keverne EB (1999) The vomeronasal organ. Science 286:716-720.

Kiryushko D, Berezin V, Bock E (2004) Regulators of neurite outgrowth: role of cell adhesion molecules. Ann N Y Acad Sci 1014:140-154.

Kolodkin AL, Tessier-Lavigne M (2011) Mechanisms and molecules of neuronal wiring: a primer. Cold Spring Harb Perspect Biol 3.

Kolpak AL, Jiang J, Guo D, Standley C, Bellve K, Fogarty K, Bao ZZ (2009) Negative guidance factor-induced macropinocytosis in the growth cone plays a critical role in repulsive axon turning. J Neurosci 29:10488-10498.

Komada M, Soriano P (2002) [Beta]IV-spectrin regulates sodium channel clustering through ankyrin-G at axon initial segments and nodes of Ranvier. J Cell Biol 156:337-348.

Kullander K, Klein R (2002) Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 3:475-486.

Kullander K, Mather NK, Diella F, Dottori M, Boyd AW, Klein R (2001) Kinase-dependent and kinase-independent functions of EphA4 receptors in major axon tract formation in vivo. Neuron 29:73-84.

Kuriyama S, Lupo G, Ohta K, Ohnuma S, Harris WA, Tanaka H (2006) Tsukushi controls ectodermal patterning and neural crest specification in Xenopus by direct regulation of BMP4 and X-delta-1 activity. Development 133:75-88.

Kuroda S, Nakagawa N, Tokunaga C, Tatematsu K, Tanizawa K (1999) Mammalian homologue of the Caenorhabditis elegans UNC-76 protein involved in axonal outgrowth is a protein kinase C zeta-interacting protein. J Cell Biol 144:403-411.

Kwasnicka-Crawford DA, Carson AR, Scherer SW (2006) IQCJ-SCHIP1, a novel fusion transcript encoding a calmodulin-binding IQ motif protein. Biochem Biophys Res Commun 350:890-899.

- L -

Lacas-Gervais S, Guo J, Strenzke N, Scarfone E, Kolpe M, Jahkel M, De Camilli P, Moser T, Rasband MN, Solimena M (2004) BetaIVSigma1 spectrin stabilizes the nodes of Ranvier and axon initial segments. J Cell Biol 166:983-990.

Lemaillet G, Walker B, Lambert S (2003) Identification of a conserved ankyrin-binding motif in the family of sodium channel alpha subunits. J Biol Chem 278:27333-27339.

Letourneau PC, Shattuck TA (1989) Distribution and possible interactions of actin-associated proteins and cell adhesion molecules of nerve growth cones. Development 105:505-519.

Li W, Lee J, Vikis HG, Lee SH, Liu G, Aurandt J, Shen TL, Fearon ER, Guan JL, Han M, Rao Y, Hong K, Guan KL (2004) Activation of FAK and Src are receptor-proximal events required for netrin signaling. Nat Neurosci 7:1213-1221.

Li X, Meriane M, Triki I, Shekarabi M, Kennedy TE, Larose L, Lamarche-Vane N (2002) The adaptor protein Nck-1 couples the netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) to the activation of the small GTPase Rac1 through an atypical mechanism. J Biol Chem 277:37788-37797.

Lin CH, Forscher P (1995) Growth cone advance is inversely proportional to retrograde F-actin flow. Neuron 14:763-771.

Lindwall C, Fothergill T, Richards LJ (2007) Commissure formation in the mammalian forebrain. Curr Opin Neurobiol 17:3-14.

Litaudon P, Amat C, Bertrand B, Vigouroux M, Buonviso N (2003) Piriform cortex functional heterogeneity revealed by cellular responses to odours. Eur J Neurosci 17:2457-2461.

Liu G, Beggs H, Jurgensen C, Park HT, Tang H, Gorski J, Jones KR, Reichardt LF, Wu J, Rao Y (2004) Netrin requires focal adhesion kinase and Src family kinases for axon outgrowth and attraction. Nat Neurosci 7:1222-1232.

Lockerbie RO, Miller VE, Pfenninger KH (1991) Regulated plasmalemmal expansion in nerve growth cones. J Cell Biol 112:1215-1227.

Lopez-Mascaraque L, De Carlos JA, Valverde F (1996) Early onset of the rat olfactory bulb projections. Neuroscience 70:255-266.

Loscher W, Ebert U (1996) The role of the piriform cortex in kindling. Prog Neurobiol 50:427-481.

Lowery LA, Van Vactor D (2009) The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. Nat Rev Mol Cell Biol 10:332-343.

Luna VM, Morozov A (2012) Input-specific excitation of olfactory cortex microcircuits. Front Neural Circuits 6:69.

Lustig M, Erskine L, Mason CA, Grumet M, Sakurai T (2001) Nr-CAM expression in the developing mouse nervous system: ventral midline structures, specific fiber tracts, and neuropilar regions. J Comp Neurol 434:13-28.

Lyuksyutova AI, Lu CC, Milanesio N, King LA, Guo N, Wang Y, Nathans J, Tessier-Lavigne M, Zou Y (2003) Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. Science 302:1984-1988.

- M -

Mackay DJ, Esch F, Furthmayr H, Hall A (1997) Rho- and rac-dependent assembly of focal adhesion complexes and actin filaments in permeabilized fibroblasts: an essential role for ezrin/radixin/moesin proteins. J Cell Biol 138:927-938.

Maertens B, Hopkins D, Franzke CW, Keene DR, Bruckner-Tuderman L, Greenspan DS, Koch M (2007) Cleavage and oligomerization of gliomedin, a transmembrane collagen required for node of ranvier formation. J Biol Chem 282:10647-10659.

Malhotra JD, Kazen-Gillespie K, Hortsch M, Isom LL (2000) Sodium channel beta subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact. J Biol Chem 275:11383-11388.

Maljevic S, Wuttke TV, Lerche H (2008) Nervous system KV7 disorders: breakdown of a subthreshold brake. J Physiol 586:1791-1801.

Mann F, Miranda E, Weinl C, Harmer E, Holt CE (2003) B-type Eph receptors and ephrins induce growth cone collapse through distinct intracellular pathways. J Neurobiol 57:323-336.

Marin-Padilla M (1971) Early prenatal ontogenesis of the cerebral cortex (neocortex) of the cat (Felis domestica). A Golgi study. I. The primordial neocortical organization. Z Anat Entwicklungsgesch 134:117-145.

Marin-Padilla M (1978) Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. Anat Embryol (Berl) 152:109-126.

Marsick BM, San Miguel-Ruiz JE, Letourneau PC (2012b) Activation of ezrin/radixin/moesin mediates attractive growth cone guidance through regulation of growth cone actin and adhesion receptors. J Neurosci 32:282-296.

Marston DJ, Dickinson S, Nobes CD (2003) Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph-ephrin contact repulsion. Nat Cell Biol 5:879-888.

Martin PM, Carnaud M, Garcia del Cano G, Irondelle M, Irinopoulou T, Girault JA, Dargent B, Goutebroze L (2008) Schwannomin-interacting protein-1 isoform IQCJ-SCHIP-1 is a late component of nodes of Ranvier and axon initial segments. J Neurosci 28:6111-6117.

Martinez-Arca S, Coco S, Mainguy G, Schenk U, Alberts P, Bouille P, Mezzina M, Prochiantz A, Matteoli M, Louvard D, Galli T (2001) A common exocytotic mechanism mediates axonal and dendritic outgrowth. J Neurosci 21:3830-3838.

Marui T, Funatogawa I, Koishi S, Yamamoto K, Matsumoto H, Hashimoto O, Nanba E, Nishida H, Sugiyama T, Kasai K, Watanabe K, Kano Y, Sasaki T, Kato N (2009) Association of the neuronal cell adhesion molecule (NRCAM) gene variants with autism. Int J Neuropsychopharmacol 12:1-10.

Masur SK, Kim YT, Wu CF (1990) Reversible inhibition of endocytosis in cultured neurons from the Drosophila temperature-sensitive mutant shibirets1. J Neurogenet 6:191-206.

Matsui T, Maeda M, Doi Y, Yonemura S, Amano M, Kaibuchi K, Tsukita S (1998) Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. J Cell Biol 140:647-657.

McClatchey AI, Fehon RG (2009) Merlin and the ERM proteins--regulators of receptor distribution and signaling at the cell cortex. Trends Cell Biol 19:198-206.

McConnell SK, Ghosh A, Shatz CJ (1994) Subplate pioneers and the formation of descending connections from cerebral cortex. J Neurosci 14:1892-1907.

McEwen DP, Meadows LS, Chen C, Thyagarajan V, Isom LL (2004) Sodium channel beta1 subunit-mediated modulation of Nav1.2 currents and cell surface density is dependent on interactions with contactin and ankyrin. J Biol Chem 279:16044-16049.

McFadden K, Minshew NJ (2013) Evidence for dysregulation of axonal growth and guidance in the etiology of ASD. Front Hum Neurosci 7:671.

McKerracher L, Chamoux M, Arregui CO (1996) Role of laminin and integrin interactions in growth cone guidance. Mol Neurobiol 12:95-116.

Meisami E, Bhatnagar KP (1998) Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. Microsc Res Tech 43:476-499.

Menegoz M, Gaspar P, Le Bert M, Galvez T, Burgaya F, Palfrey C, Ezan P, Arnos F, Girault JA (1997) Paranodin, a glycoprotein of neuronal paranodal membranes. Neuron 19:319-331.

Menzies AS, Aszodi A, Williams SE, Pfeifer A, Wehman AM, Goh KL, Mason CA, Fassler R, Gertler FB (2004) Mena and vasodilator-stimulated phosphoprotein are required for multiple actin-dependent processes that shape the vertebrate nervous system. J Neurosci 24:8029-8038.

Mintz CD, Carcea I, McNickle DG, Dickson TC, Ge Y, Salton SR, Benson DL (2008) ERM proteins regulate growth cone responses to Sema3A. J Comp Neurol 510:351-366.

Mirsky R, Jessen KR, Brennan A, Parkinson D, Dong Z, Meier C, Parmantier E, Lawson D (2002) Schwann cells as regulators of nerve development. J Physiol Paris 96:17-24.

Miyamichi K, Amat F, Moussavi F, Wang C, Wickersham I, Wall NR, Taniguchi H, Tasic B, Huang ZJ, He Z, Callaway EM, Horowitz MA, Luo L (2011) Cortical representations of olfactory input by trans-synaptic tracing. Nature 472:191-196.

Mohler PJ, Gramolini AO, Bennett V (2002) The ankyrin-B C-terminal domain determines activity of ankyrin-B/G chimeras in rescue of abnormal inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptor distribution in ankyrin-B (-/-) neonatal cardiomyocytes. J Biol Chem 277:10599-10607.

Moldrich RX, Mezzera C, Holmes WM, Goda S, Brookfield SJ, Rankin AJ, Barr E, Kurniawan N, Dewar D, Richards LJ, Lopez-Bendito G, Iwata T (2011) Fgfr3 regulates development of the caudal telencephalon. Dev Dyn 240:1586-1599.

Mombaerts P (2006) Axonal wiring in the mouse olfactory system. Annu Rev Cell Dev Biol 22:713-737.

Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J, Axel R (1996) Visualizing an olfactory sensory map. Cell 87:675-686.

Moriceau S, Sullivan RM (2004) Unique neural circuitry for neonatal olfactory learning. J Neurosci 24:1182-1189.

Morris SA, Almeida AD, Tanaka H, Ohta K, Ohnuma S (2007) Tsukushi modulates Xnr2, FGF and BMP signaling: regulation of Xenopus germ layer formation. PLoS One 2:e1004.

Morrison H, Sperka T, Manent J, Giovannini M, Ponta H, Herrlich P (2007) Merlin/neurofibromatosis type 2 suppresses growth by inhibiting the activation of Ras and Rac. Cancer Res 67:520-527.

Moy SS, Nonneman RJ, Young NB, Demyanenko GP, Maness PF (2009) Impaired sociability and cognitive function in Nrcam-null mice. Behav Brain Res 205:123-131.

Mundigl O, Ochoa GC, David C, Slepnev VI, Kabanov A, De Camilli P (1998) Amphiphysin I antisense oligonucleotides inhibit neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. J Neurosci 18:93-103.

Murakami T, Ohtsuka A (2003) Perisynaptic barrier of proteoglycans in the mature brain and spinal cord. Arch Histol Cytol 66:195-207.

Muranen T, Gronholm M, Lampin A, Lallemand D, Zhao F, Giovannini M, Carpen O (2007) The tumor suppressor merlin interacts with microtubules and modulates Schwann cell microtubule cytoskeleton. Hum Mol Genet 16:1742-1751.

Musacchio A, Noble M, Pauptit R, Wierenga R, Saraste M (1992) Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain. Nature 359:851-855.

Myers JP, Santiago-Medina M, Gomez TM (2011) Regulation of axonal outgrowth and pathfinding by integrin-ECM interactions. Dev Neurobiol 71:901-923.

- N -

Narboux-Neme N, Gaspar P (2008) Développement du cortex cérébral : apports récents des études chez la souris et les primates. Epilepsies 20:220-228.

Neugebauer KM, Tomaselli KJ, Lilien J, Reichardt LF (1988) N-cadherin, NCAM, and integrins promote retinal neurite outgrowth on astrocytes in vitro. J Cell Biol 107:1177-1187.

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

Nishikimi M, Oishi K, Nakajima K (2013) Axon guidance mechanisms for establishment of callosal connections. Neural Plast 2013:149060.

Nishimura K, Yoshihara F, Tojima T, Ooashi N, Yoon W, Mikoshiba K, Bennett V, Kamiguchi H (2003a) L1-dependent neuritogenesis involves ankyrinB that mediates L1-CAM coupling with retrograde actin flow. J Cell Biol 163:1077-1088.

Nishimura T, Fukata Y, Kato K, Yamaguchi T, Matsuura Y, Kamiguchi H, Kaibuchi K (2003b) CRMP-2 regulates polarized Numb-mediated endocytosis for axon growth. Nat Cell Biol 5:819-826.

Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. Nat Neurosci 7:136-144.

Nomura T, Osumi N (2004) Misrouting of mitral cell progenitors in the Pax6/small eye rat telencephalon. Development 131:787-796.

- O -

Ogawa Y, Oses-Prieto J, Kim MY, Horresh I, Peles E, Burlingame AL, Trimmer JS, Meijer D, Rasband MN (2010) ADAM22, a Kv1 channel-interacting protein, recruits membrane-associated guanylate kinases to juxtaparanodes of myelinated axons. J Neurosci 30:1038-1048.

Ogawa Y, Schafer DP, Horresh I, Bar V, Hales K, Yang Y, Susuki K, Peles E, Stankewich MC, Rasband MN (2006) Spectrins and ankyrinB constitute a specialized paranodal cytoskeleton. J Neurosci 26:5230-5239.

Ohta K, Kuriyama S, Okafuji T, Gejima R, Ohnuma S, Tanaka H (2006) Tsukushi cooperates with VG1 to induce primitive streak and Hensen's node formation in the chick embryo. Development 133:3777-3786.

Ohta K, Lupo G, Kuriyama S, Keynes R, Holt CE, Harris WA, Tanaka H, Ohnuma S (2004) Tsukushi functions as an organizer inducer by inhibition of BMP activity in cooperation with chordin. Dev Cell 7:347-358.

Ojima H, Mori K, Kishi K (1984) The trajectory of mitral cell axons in the rabbit olfactory cortex revealed by intracellular HRP injection. J Comp Neurol 230:77-87.

Osmani N, Peglion F, Chavrier P, Etienne-Manneville S (2010) Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic. J Cell Biol 191:1261-1269.

- P -

Paglini G, Kunda P, Quiroga S, Kosik K, Caceres A (1998) Suppression of radixin and moesin alters growth cone morphology, motility, and process formation in primary cultured neurons. J Cell Biol 143:443-455.

Palamidessi A, Frittoli E, Garre M, Faretta M, Mione M, Testa I, Diaspro A, Lanzetti L, Scita G, Di Fiore PP (2008) Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. Cell 134:135-147.

Palmer A, Zimmer M, Erdmann KS, Eulenburg V, Porthin A, Heumann R, Deutsch U, Klein R (2002) EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. Mol Cell 9:725-737.

Pan Z, Kao T, Horvath Z, Lemos J, Sul JY, Cranstoun SD, Bennett V, Scherer SS, Cooper EC (2006) A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. J Neurosci 26:2599-2613.

Panda D, Miller HP, Banerjee A, Luduena RF, Wilson L (1994) Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition. Proc Natl Acad Sci U S A 91:11358-11362.

Park E, Kim Y, Noh H, Lee H, Yoo S, Park S (2013) EphA/ephrin-A signaling is critically involved in region-specific apoptosis during early brain development. Cell Death Differ 20:169-180.

Park JI, Tsai SY, Tsai MJ (2003) Molecular mechanism of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) actions. Keio J Med 52:174-181.

Parkinson NJ, Olsson CL, Hallows JL, McKee-Johnson J, Keogh BP, Noben-Trauth K, Kujawa SG, Tempel BL (2001) Mutant beta-spectrin 4 causes auditory and motor neuropathies in quivering mice. Nat Genet 29:61-65.

Pasquale EB (2005) Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. Nat Rev Mol Cell Biol 6:462-475.

Pasterkamp RJ, Kolodkin AL (2003) Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity. Curr Opin Neurobiol 13:79-89.

Patil MM, Linster C, Lubenov E, Hasselmo ME (1998) Cholinergic agonist carbachol enables associative long-term potentiation in piriform cortex slices. J Neurophysiol 80:2467-2474.

Peles E, Nativ M, Lustig M, Grumet M, Schilling J, Martinez R, Plowman GD, Schlessinger J (1997) Identification of a novel contactin-associated transmembrane receptor with multiple domains implicated in protein-protein interactions. EMBO J 16:978-988.

Peretti D, Peris L, Rosso S, Quiroga S, Caceres A (2000) Evidence for the involvement of KIF4 in the anterograde transport of L1-containing vesicles. J Cell Biol 149:141-152.

Pfenninger KH, Friedman LB (1993) Sites of plasmalemmal expansion in growth cones. Brain Res Dev Brain Res 71:181-192.

Piper M, Salih S, Weinl C, Holt CE, Harris WA (2005) Endocytosis-dependent desensitization and protein synthesis-dependent resensitization in retinal growth cone adaptation. Nat Neurosci 8:179-186.

Pires-Neto MA, Lent R (1993) The prenatal development of the anterior commissure in hamsters: pioneer fibers lead the way. Brain Res Dev Brain Res 72:59-66.

Poliak S, Peles E (2003) The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. Nat Rev Neurosci 4:968-980.

Poliak S, Salomon D, Elhanany H, Sabanay H, Kiernan B, Pevny L, Stewart CL, Xu X, Chiu SY, Shrager P, Furley AJ, Peles E (2003) Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K+ channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. J Cell Biol 162:1149-1160.

Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. Cell 112:453-465.

Poo C, Isaacson JS (2009) Odor representations in olfactory cortex: "sparse" coding, global inhibition, and oscillations. Neuron 62:850-861.

- R -

Rasband MN (2011) Composition, assembly, and maintenance of excitable membrane domains in myelinated axons. Semin Cell Dev Biol 22:178-184.

Rasband MN, Peles E, Trimmer JS, Levinson SR, Lux SE, Shrager P (1999) Dependence of nodal sodium channel clustering on paranodal axoglial contact in the developing CNS. J Neurosci 19:7516-7528.

Rasband MN, Park EW, Zhen D, Arbuckle MI, Poliak S, Peles E, Grant SG, Trimmer JS (2002) Clustering of neuronal potassium channels is independent of their interaction with PSD-95. J Cell Biol 159:663-672.

Ren XR, Ming GL, Xie Y, Hong Y, Sun DM, Zhao ZQ, Feng Z, Wang Q, Shim S, Chen ZF, Song HJ, Mei L, Xiong WC (2004) Focal adhesion kinase in netrin-1 signaling. Nat Neurosci 7:1204-1212.

Rennaker RL, Chen CF, Ruyle AM, Sloan AM, Wilson DA (2007) Spatial and temporal distribution of odorant-evoked activity in the piriform cortex. J Neurosci 27:1534-1542.

Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB (1994) A molecular dissection of spatial patterning in the olfactory system. Curr Opin Neurobiol 4:588-596.

Rios JC, Melendez-Vasquez CV, Einheber S, Lustig M, Grumet M, Hemperly J, Peles E, Salzer JL (2000) Contactin-associated protein (Caspr) and contactin form a complex that is targeted to the paranodal junctions during myelination. J Neurosci 20:8354-8364.

Rios JC, Rubin M, St Martin M, Downey RT, Einheber S, Rosenbluth J, Levinson SR, Bhat M, Salzer JL (2003) Paranodal interactions regulate expression of sodium channel subtypes and provide a diffusion barrier for the node of Ranvier. J Neurosci 23:7001-7011.

Rong R, Surace EI, Haipek CA, Gutmann DH, Ye K (2004) Serine 518 phosphorylation modulates merlin intramolecular association and binding to critical effectors important for NF2 growth suppression. Oncogene 23:8447-8454.

Rossman KL, Der CJ, Sondek J (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. Nat Rev Mol Cell Biol 6:167-180.

Roth TL, Sullivan RM (2005) Memory of early maltreatment: neonatal behavioral and neural correlates of maternal maltreatment within the context of classical conditioning. Biol Psychiatry 57:823-831.

Rouleau GA, Merel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman J, Marineau C, Hoang-Xuan K, Demczuk S, Desmaze C, Plougastel B, et al. (1993) Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. Nature 363:515-521.

Runker AE, O'Tuathaigh C, Dunleavy M, Morris DW, Little GE, Corvin AP, Gill M, Henshall DC, Waddington JL, Mitchell KJ (2011) Mutation of Semaphorin-6A disrupts limbic and cortical connectivity and models neurodevelopmental psychopathology. PLoS One 6:e26488.

Ruthel G, Hollenbeck PJ (2003) Response of mitochondrial traffic to axon determination and differential branch growth. J Neurosci 23:8618-8624.

- S -

Sabo SL, McAllister AK (2003) Mobility and cycling of synaptic protein-containing vesicles in axonal growth cone filopodia. Nat Neurosci 6:1264-1269.

Sabry JH, O'Connor TP, Evans L, Toroian-Raymond A, Kirschner M, Bentley D (1991) Microtubule behavior during guidance of pioneer neuron growth cones in situ. J Cell Biol 115:381-395.

Saha B, Hari P, Huilgol D, Tole S (2007) Dual role for LIM-homeodomain gene Lhx2 in the formation of the lateral olfactory tract. J Neurosci 27:2290-2297.

Sahay A, Molliver ME, Ginty DD, Kolodkin AL (2003) Semaphorin 3F is critical for development of limbic system circuitry and is required in neurons for selective CNS axon guidance events. J Neurosci 23:6671-6680.

Sakurai T, Lustig M, Babiarz J, Furley AJ, Tait S, Brophy PJ, Brown SA, Brown LY, Mason CA, Grumet M (2001) Overlapping functions of the cell adhesion molecules Nr-CAM and L1 in cerebellar granule cell development. J Cell Biol 154:1259-1273.

Sakurai T, Gil OD, Whittard JD, Gazdoiu M, Joseph T, Wu J, Waksman A, Benson DL, Salton SR, Felsenfeld DP (2008) Interactions between the L1 cell adhesion molecule and ezrin support traction-force generation and can be regulated by tyrosine phosphorylation. J Neurosci Res 86:2602-2614.

Sanchez C, Diaz-Nido J, Avila J (2000) Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. Prog Neurobiol 61:133-168.

Sarma AA, Richard MB, Greer CA (2011) Developmental dynamics of piriform cortex. Cereb Cortex 21:1231-1245.

Sato Y, Hirata T, Ogawa M, Fujisawa H (1998) Requirement for early-generated neurons recognized by monoclonal antibody lot1 in the formation of lateral olfactory tract. J Neurosci 18:7800-7810.

Savvaki M, Theodorakis K, Zoupi L, Stamatakis A, Tivodar S, Kyriacou K, Stylianopoulou F, Karagogeos D (2010) The expression of TAG-1 in glial cells is sufficient for the formation of the juxtaparanodal complex and the phenotypic rescue of tag-1 homozygous mutants in the CNS. J Neurosci 30:13943-13954.

Schaefer AW, Kamiguchi H, Wong EV, Beach CM, Landreth G, Lemmon V (1999) Activation of the MAPK signal cascade by the neural cell adhesion molecule L1 requires L1 internalization. J Biol Chem 274:37965-37973.

Schaefer AW, Kamei Y, Kamiguchi H, Wong EV, Rapoport I, Kirchhausen T, Beach CM, Landreth G, Lemmon SK, Lemmon V (2002) L1 endocytosis is controlled by a phosphorylation-dephosphorylation cycle stimulated by outside-in signaling by L1. J Cell Biol 157:1223-1232.

Schaefer L, Iozzo RV (2008) Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. J Biol Chem 283:21305-21309.

Schmid RS, Pruitt WM, Maness PF (2000) A MAP kinase-signaling pathway mediates neurite outgrowth on L1 and requires Src-dependent endocytosis. J Neurosci 20:4177-4188.

Schneider S, Gulacsi A, Hatten ME (2011) Lrp12/Mig13a reveals changing patterns of preplate neuronal polarity during corticogenesis that are absent in reeler mutant mice. Cereb Cortex 21:134-144.

Schulz A, Geissler KJ, Kumar S, Leichsenring G, Morrison H, Baader SL (2010) Merlin inhibits neurite outgrowth in the CNS. J Neurosci 30:10177-10186.

Schwob JE, Price JL (1984) The development of lamination of afferent fibers to the olfactory cortex in rats, with additional observations in the adult. J Comp Neurol 223:203-222.

Scoles DR, Huynh DP, Morcos PA, Coulsell ER, Robinson NG, Tamanoi F, Pulst SM (1998) Neurofibromatosis 2 tumour suppressor schwannomin interacts with betaII-spectrin. Nat Genet 18:354-359.

Scotland P, Zhou D, Benveniste H, Bennett V (1998) Nervous system defects of AnkyrinB (-/-) mice suggest functional overlap between the cell adhesion molecule L1 and 440-kD AnkyrinB in premyelinated axons. J Cell Biol 143:1305-1315.

Seki T, Arai Y (1991) Expression of highly polysialylated NCAM in the neocortex and piriform cortex of the developing and the adult rat. Anat Embryol (Berl) 184:395-401.

Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M (1996) Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. Cell 87:1001-1014.

Shaw RJ, Paez JG, Curto M, Yaktine A, Pruitt WM, Saotome I, O'Bryan JP, Gupta V, Ratner N, Der CJ, Jacks T, McClatchey AI (2001) The Nf2 tumor suppressor, merlin, functions in Rac-dependent signaling. Dev Cell 1:63-72.

Shen Y, Mani S, Donovan SL, Schwob JE, Meiri KF (2002) Growth-associated protein-43 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. J Neurosci 22:239-247.

Shepherd GM (1994) Discrimination of molecular signals by the olfactory receptor neuron. Neuron 13:771-790.

Shepherd GM (2011) The microcircuit concept applied to cortical evolution: from three-layer to six-layer cortex. Front Neuroanat 5:30.

Sherman DL, Brophy PJ (2005) Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. Nat Rev Neurosci 6:683-690.

Shimada T, Toriyama M, Uemura K, Kamiguchi H, Sugiura T, Watanabe N, Inagaki N (2008) Shootin1 interacts with actin retrograde flow and L1-CAM to promote axon outgrowth. J Cell Biol 181:817-829.

Shotton DM, Burke BE, Branton D (1979) The molecular structure of human erythrocyte spectrin. Biophysical and electron microscopic studies. J Mol Biol 131:303-329.

Shu T, Butz KG, Plachez C, Gronostajski RM, Richards LJ (2003) Abnormal development of forebrain midline glia and commissural projections in Nfia knock-out mice. J Neurosci 23:203-212.

Simonovic M, Zhang Z, Cianci CD, Steitz TA, Morrow JS (2006) Structure of the calmodulin alphaII-spectrin complex provides insight into the regulation of cell plasticity. J Biol Chem 281:34333-34340.

Sosulski DL, Bloom ML, Cutforth T, Axel R, Datta SR (2011) Distinct representations of olfactory information in different cortical centres. Nature 472:213-216.

Soussi-Yanicostas N, de Castro F, Julliard AK, Perfettini I, Chedotal A, Petit C (2002) Anosmin-1, defective in the X-linked form of Kallmann syndrome, promotes axonal branch formation from olfactory bulb output neurons. Cell 109:217-228.

Speicher DW, Marchesi VT (1984) Erythrocyte spectrin is comprised of many homologous triple helical segments. Nature 311:177-180.

Srinivasan J, Schachner M, Catterall WA (1998) Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. Proc Natl Acad Sci U S A 95:15753-15757.

Stabach PR, Simonovic I, Ranieri MA, Aboodi MS, Steitz TA, Simonovic M, Morrow JS (2009) The structure of the ankyrin-binding site of beta-spectrin reveals how tandem spectrin-repeats generate unique ligand-binding properties. Blood 113:5377-5384.

Stamenkovic I, Yu Q (2010) Merlin, a "magic" linker between extracellular cues and intracellular signaling pathways that regulate cell motility, proliferation, and survival. Curr Protein Pept Sci 11:471-484.

Stewart GR, Pearlman AL (1987) Fibronectin-like immunoreactivity in the developing cerebral cortex. J Neurosci 7:3325-3333.

Stoeckli ET, Landmesser LT (1995) Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play different roles in the in vivo guidance of chick commissural neurons. Neuron 14:1165-1179.

Stokes CC, Isaacson JS (2010) From dendrite to soma: dynamic routing of inhibition by complementary interneuron microcircuits in olfactory cortex. Neuron 67:452-465.

Sullivan RM, Wilson DA, Wong R, Correa A, Leon M (1990) Modified behavioral and olfactory bulb responses to maternal odors in preweanling rats. Brain Res Dev Brain Res 53:243-247.

Suto F, Ito K, Uemura M, Shimizu M, Shinkawa Y, Sanbo M, Shinoda T, Tsuboi M, Takashima S, Yagi T, Fujisawa H (2005) Plexin-a4 mediates axon-repulsive activities of both secreted and transmembrane semaphorins and plays roles in nerve fiber guidance. J Neurosci 25:3628-3637.

Suzuki N, Bekkers JM (2006) Neural coding by two classes of principal cells in the mouse piriform cortex. J Neurosci 26:11938-11947.

Suzuki N, Bekkers JM (2007) Inhibitory interneurons in the piriform cortex. Clin Exp Pharmacol Physiol 34:1064-1069.

Suzuki N, Bekkers JM (2010a) Inhibitory neurons in the anterior piriform cortex of the mouse: classification using molecular markers. J Comp Neurol 518:1670-1687.

Suzuki N, Bekkers JM (2010b) Distinctive classes of GABAergic interneurons provide layer-specific phasic inhibition in the anterior piriform cortex. Cereb Cortex 20:2971-2984.

Suzuki N, Bekkers JM (2011) Two layers of synaptic processing by principal neurons in piriform cortex. J Neurosci 31:2156-2166.

- T -

Tanaka E, Ho T, Kirschner MW (1995) The role of microtubule dynamics in growth cone motility and axonal growth. J Cell Biol 128:139-155.

Tejero-Diez P, Rodriguez-Sanchez P, Martin-Cofreces NB, Diez-Guerra FJ (2000) bFGF stimulates GAP-43 phosphorylation at ser41 and modifies its intracellular localization in cultured hippocampal neurons. Mol Cell Neurosci 16:766-780.

Thaxton C, Pillai AM, Pribisko AL, Dupree JL, Bhat MA (2011) Nodes of Ranvier act as barriers to restrict invasion of flanking paranodal domains in myelinated axons. Neuron 69:244-257.

Thoumine O (2008) Interplay between adhesion turnover and cytoskeleton dynamics in the control of growth cone migration. Cell Adh Migr 2:263-267.

Tischfield MA et al. (2010) Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance. Cell 140:74-87.

Tissir F, De-Backer O, Goffinet AM, Lambert de Rouvroit C (2002) Developmental expression profiles of Celsr (Flamingo) genes in the mouse. Mech Dev 112:157-160.

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

Tojima T, Hines JH, Henley JR, Kamiguchi H (2011) Second messengers and membrane trafficking direct and organize growth cone steering. Nat Rev Neurosci 12:191-203.

Tojima T, Akiyama H, Itofusa R, Li Y, Katayama H, Miyawaki A, Kamiguchi H (2007) Attractive axon guidance involves asymmetric membrane transport and exocytosis in the growth cone. Nat Neurosci 10:58-66.

Tole S, Gutin G, Bhatnagar L, Remedios R, Hebert JM (2006) Development of midline cell types and commissural axon tracts requires Fgfr1 in the cerebrum. Dev Biol 289:141-151.

Tomioka N, Osumi N, Sato Y, Inoue T, Nakamura S, Fujisawa H, Hirata T (2000) Neocortical origin and tangential migration of guidepost neurons in the lateral olfactory tract. J Neurosci 20:5802-5812.

Traka M, Goutebroze L, Denisenko N, Bessa M, Nifli A, Havaki S, Iwakura Y, Fukamauchi F, Watanabe K, Soliven B, Girault JA, Karagogeos D (2003) Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. J Cell Biol 162:1161-1172.

Trave G, Lacombe PJ, Pfuhl M, Saraste M, Pastore A (1995) Molecular mechanism of the calcium-induced conformational change in the spectrin EF-hands. EMBO J 14:4922-4931.

Treubert U, Brummendorf T (1998) Functional cooperation of beta1-integrins and members of the Ig superfamily in neurite outgrowth induction. J Neurosci 18:1795-1805.

Trinh-Trang-Tan MM, Bigot S, Picot J, Lecomte MC, Kordeli E (2014) AlphaII-spectrin participates in the surface expression of cell adhesion molecule L1 and neurite outgrowth. Exp Cell Res 322:365-380.

Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL, Murrell JR, Duyao MP, Parry DM, Eldridge R, Kley N, Menon AG, Pulaski K, et al. (1993) A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. Cell 75:826.

Tsukita S, Hieda Y (1989) A new 82-kD barbed end-capping protein (radixin) localized in the cell-to-cell adherens junction: purification and characterization. J Cell Biol 108:2369-2382.

Tzoumaka E, Tischler AC, Sangameswaran L, Eglen RM, Hunter JC, Novakovic SD (2000) Differential distribution of the tetrodotoxin-sensitive rPN4/NaCh6/Scn8a sodium channel in the nervous system. J Neurosci Res 60:37-44.

- U -

Uemoto Y, Suzuki S, Terada N, Ohno N, Ohno S, Yamanaka S, Komada M (2007) Specific role of the truncated betaIV-spectrin Sigma6 in sodium channel clustering at axon initial segments and nodes of ranvier. J Biol Chem 282:6548-6555.

- V -

Van Wart A, Trimmer JS, Matthews G (2007) Polarized distribution of ion channels within microdomains of the axon initial segment. J Comp Neurol 500:339-352.

Vanderhaeghen P, Cheng HJ (2010) Guidance molecules in axon pruning and cell death. Cold Spring Harb Perspect Biol 2:a001859.

Vitalis T, Rossier J (2011) New insights into cortical interneurons development and classification: contribution of developmental studies. Dev Neurobiol 71:34-44.

Vitriol EA, Zheng JQ (2012) Growth cone travel in space and time: the cellular ensemble of cytoskeleton, adhesion, and membrane. Neuron 73:1068-1081.

Voineagu I, Wang X, Johnston P, Lowe JK, Tian Y, Horvath S, Mill J, Cantor RM, Blencowe BJ, Geschwind DH (2011) Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. Nature 474:380-384.

- W -

Wang Y, Thekdi N, Smallwood PM, Macke JP, Nathans J (2002) Frizzled-3 is required for the development of major fiber tracts in the rostral CNS. J Neurosci 22:8563-8573.

Waxman SG, Black JA, Foster RE (1983) Ontogenesis of the axolemma and axoglial relationships in myelinated fibers: electrophysiological and freeze-fracture correlates of membrane plasticity. Int Rev Neurobiol 24:433-484.

Wilson DA, Stevenson RJ (2003) Olfactory perceptual learning: the critical role of memory in odor discrimination. Neurosci Biobehav Rev 27:307-328.

Wilson DA, Sullivan RM (2011) Cortical processing of odor objects. Neuron 72:506-519.

Woolf TB, Shepherd GM, Greer CA (1991) Serial reconstructions of granule cell spines in the mammalian olfactory bulb. Synapse 7:181-192.

Wu B, Decourt B, Zabidi MA, Wuethrich LT, Kim WH, Zhou Z, MacIsaac K, Suter DM (2008) Microtubule-mediated Src tyrosine kinase trafficking in neuronal growth cones. Mol Biol Cell 19:4611-4627.

- X -

Xu HM, Gutmann DH (1998) Merlin differentially associates with the microtubule and actin cytoskeleton. J Neurosci Res 51:403-415.

Xu NJ, Henkemeyer M (2009) Ephrin-B3 reverse signaling through Grb4 and cytoskeletal regulators mediates axon pruning. Nat Neurosci 12:268-276.

Xu NJ, Henkemeyer M (2012) Ephrin reverse signaling in axon guidance and synaptogenesis. Semin Cell Dev Biol 23:58-64.

- Y -

Yamada KM, Wessells NK (1971) Axon elongation. Effect of nerve growth factor on microtubule protein. Exp Cell Res 66:346-352.

Yamada KM, Spooner BS, Wessells NK (1971) Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells. J Cell Biol 49:614-635.

Yamatani H, Sato Y, Fujisawa H, Hirata T (2004) Chronotopic organization of olfactory bulb axons in the lateral olfactory tract. J Comp Neurol 475:247-260.

Yang Y, Ogawa Y, Hedstrom KL, Rasband MN (2007) betaIV spectrin is recruited to axon initial segments and nodes of Ranvier by ankyrinG. J Cell Biol 176:509-519.

Yang Y, Lacas-Gervais S, Morest DK, Solimena M, Rasband MN (2004) BetaIV spectrins are essential for membrane stability and the molecular organization of nodes of Ranvier. J Neurosci 24:7230-7240.

Yoshikawa S, McKinnon RD, Kokel M, Thomas JB (2003) Wnt-mediated axon guidance via the Drosophila Derailed receptor. Nature 422:583-588.

Yoshimura T, Rasband MN (2014) Axon initial segments: diverse and dynamic neuronal compartments. Curr Opin Neurobiol 27C:96-102.

Yu FH, Catterall WA (2003) Overview of the voltage-gated sodium channel family. Genome Biol 4:207.

Yu TW, Bargmann CI (2001) Dynamic regulation of axon guidance. Nat Neurosci 4 Suppl:1169-1176.

- Z -

Zhan C, Luo M (2010) Diverse patterns of odor representation by neurons in the anterior piriform cortex of awake mice. J Neurosci 30:16662-16672.

Zhang X, Firestein S (2002) The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. Nat Neurosci 5:124-133.

Zhao C, Takita J, Tanaka Y, Setou M, Nakagawa T, Takeda S, Yang HW, Terada S, Nakata T, Takei Y, Saito M, Tsuji S, Hayashi Y, Hirokawa N (2001) Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. Cell 105:587-597.

Zhou D, Lambert S, Malen PL, Carpenter S, Boland LM, Bennett V (1998) AnkyrinG is required for clustering of voltage-gated Na channels at axon initial segments and for normal action potential firing. J Cell Biol 143:1295-1304.

Zhou L, Goffinet AM, Tissir F (2008a) [Role of the cadherin Celsr3 in the connectivity of the cerebral cortex]. Med Sci (Paris) 24:1025-1027.

Zhou L, Bar I, Achouri Y, Campbell K, De Backer O, Hebert JM, Jones K, Kessaris N, de Rouvroit CL, O'Leary D, Richardson WD, Goffinet AM, Tissir F (2008b) Early forebrain wiring: genetic dissection using conditional Celsr3 mutant mice. Science 320:946-949.

Zimmer M, Palmer A, Kohler J, Klein R (2003) EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. Nat Cell Biol 5:869-878.

Zonta B, Tait S, Melrose S, Anderson H, Harroch S, Higginson J, Sherman DL, Brophy PJ (2008) Glial and neuronal isoforms of Neurofascin have distinct roles in the assembly of nodes of Ranvier in the central nervous system. J Cell Biol 181:1169-1177.