



**HAL**  
open science

# Rôle des microtubules et de l'acto-myosine dans la migration des interneurons corticaux

Jean-Pierre Baudoin

► **To cite this version:**

Jean-Pierre Baudoin. Rôle des microtubules et de l'acto-myosine dans la migration des interneurons corticaux. Neurosciences. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2008. Français. NNT : 2008PA066111 . tel-00811604

**HAL Id: tel-00811604**

**<https://theses.hal.science/tel-00811604>**

Submitted on 10 Apr 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT**  
**UNIVERSITE PARIS VI – PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité : Neurosciences  
Ecole Doctorale : Cerveau-Comportement-Cognition

Présentée par

**Jean-Pierre BAUDOIN**

En vue de l'obtention du grade de  
Docteur de l'Université Paris VI – Pierre et Marie Curie

Sujet de la Thèse :

**Rôle des microtubules et de l'acto-myosine  
dans la migration des interneurons corticaux**

Soutenue le 27 Mars 2008

devant le jury composé de :

Pr Jean Mariani  
Pr André Goffinet  
Dr Harold Crémer  
Dr Michel Bornens  
Dr Pascale Dupuis-Williams  
Dr Christine Métin

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examinateur  
Examinatrice  
Directrice de Thèse

# REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord Christine Métin, qui a été formidable pendant ces années de recherche à ses côtés. Ses qualités scientifiques et surtout son goût pour la recherche et son enthousiasme m'ont permis de m'épanouir, de goûter au frisson de la découverte, attendue ou inattendue, et d'apprendre ainsi petit-à-petit le métier de chercheur. J'espère en être digne et pouvoir dans le futur utiliser cet enseignement pour réaliser de nouveaux travaux.

Je remercie chaleureusement Patricia Gaspar, car notre rencontre m'a permis de mettre un pied dans le monde de la recherche (puis deux et tout entier...). J'ai eu plaisir à accompagner l'unité 616, qui restera pour moi un lieu où j'ai beaucoup appris, du métier comme de moi-même. Merci encore pour cette rencontre avec ta personne et bien plus encore.

Je remercie vivement Michel Bornens, sans qui mon étude n'aurait pas été possible, car il a su me conseiller justement et m'aider en me confiant des outils très utiles. Merci encore pour votre gentillesse et votre humilité. Vos formidables travaux m'ont passionné, et je n'oublierai pas le karyomastigont...

Je remercie Chantal Alvarez, notre super technicienne qui m'a enseigné le travail pratique de laboratoire et les méthodes les plus pertinentes pour réaliser mes travaux. Un très grand merci car elle a beaucoup contribué à mon travail de thèse. Je lui dois donc beaucoup. Merci super 'Chantal-TubTyr-TubGlu' !!

Je remercie les membres du jury, messieurs Jean Mariani, André Goffinet, Harold Crémer et madame Pascale Dupuis-Williams pour m'avoir pour certains suivi pendant cette thèse, et pour d'autres j'espère découvert avec plaisir lors de la lecture de ce manuscrit. Merci à vous pour votre participation à ce jury.

Je remercie Jean-Paul Rio, qui m'a enseigné la microscopie électronique et a grandement contribué à ce projet. Un très grand merci à cet artisan de la microscopie, qui m'a communiqué l'esthétique et le sens de la morphologie. Jean-Paul, je n'oublierai pas les grains de Palade.

Je remercie Jean-Pierre Lechaire, qui m'a permis de réaliser mon étude par tomographie électronique, et qui m'a très bien conseillé et aidé à la réalisation de ces travaux. Sa gentillesse a accompagné nos séances de tomographie, et nos discussions alors furent très intéressantes et très agréables. J'ai chaque fois été ravi de me rendre à Jussieu, je savais que j'allais passer un bon moment....

Je remercie Graca Raposo pour m'avoir enseigné les rudiments de la cryo-microscopie, d'une façon très détendue et très amicale. Ce fut un grand plaisir de me rendre à l'Institut Curie, et je ne doute pas que cet enseignement pourra servir dans le futur.

Je remercie Caroline Kappeler, avec qui j'ai eu plaisir à partager un bout de chemin scientifique. Merci Caroline pour ta gentillesse, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi et de me pencher à tes côtés sur nos petites cellules.

Je remercie Fiona Francis pour ses conseils et nos discussions très stimulantes. Merci pour ton accent et ta gentillesse.

Je remercie Kalid Hamid El Hachimi pour son aide en microscopie électronique et sa bonne humeur. Merci Hamid, tu resteras dans mon cœur.

Je remercie Dominique Langui, qui m'aura toujours aidé de façon très efficace lors de mes travaux à la Pitié. Merci pour ta disponibilité et ta bonne humeur. Ce fut un très grand plaisir de travailler à tes côtés et de rire en ta compagnie.

Je remercie Denis Lecren, 'le photographe', pour sa sympathie et son aide pour avoir couché sur le papier nos jolies cellules.

Je remercie Aude Muzerelle, pour son humour et sa gentillesse, et son aide dès que nous avons besoin de quoi que ce soit.

Je remercie Serge Marty pour sa sympathie et ses conseils très utiles en tomographie électronique. Merci Serge pour ton humilité et ta bonne humeur.

Je remercie Léa et Xavier, anciens de l'U106-U616 de la Pitié-Salpêtrière, avec qui j'ai passé des moments très forts aux niveaux humain et scientifique. Merci pour votre gentillesse et les moments que nous avons passé ensemble. Vous êtes des amis.

Je remercie Nicole Foucault et Samira Mimouni pour leur aide précieuse à l'U616 et leur gentillesse. Vous avez grandement facilité mon travail et je vous en suis reconnaissant.

Je remercie les étudiants du groupe de Christine Métin qui ont travaillé à mes côtés durant ces années : merci Nathalie Néric, l' 'américaine', Laetitia Hennekine, formidable, et Florent Pégion, atypique, qui, je l'espère, aura plaisir à reprendre le flambeau.

Je remercie les membres de l'Institut du Fer-à-Moulin pour leur accueil chaleureux. Mon passage aura été court en ce lieu mais il aura été très intense, j'y aurai passé des moments forts, en particulier l'écriture de cette thèse...

Je remercie Matthieu Letellier, mon ami, qui a vécu en même temps que moi l'expérience de la thèse, et à qui j'ai pu confier mes doutes ou mes joies, sur mon travail ou la vie en général. Merci Mat' mi hernano pour ton amitié, et bravo pour ton travail remarquable.

Je remercie Riski, du bar 'Le Cyrano' (rue Saint-Martin), mon Q.G, avec qui j'ai pu décompresser dans les moments de doute (sans abus !..) ou bien simplement discuter des choses de la vie. Merci donc 'Riski les bons tuyaux'. Pour rester dans le thème, je remercie François du bar l'Ariel (en face la Pitié mais qui malheureusement a changé de propriétaire..), pour sa grande gentillesse. Merci donc aux débitants de boisson et de bons moments.

Je remercie mes amis de longue date qui m'ont encouragé durant mon parcours universitaire, que j'ai quittés par la distance mais gardés dans le cœur : Rémi (l'unique), Fanéou (de Melun), Kevin (le surfeur), Vince (le révolutionnaire), Thomas (le grand), le Quartier (Cédric, Cyril et Nordine) et tous les autres que je ne cite pas pour ne pas épuiser le lecteur...

Je remercie M.Pellenc, professeur de français au collège Marcel Pagnol, et M.Claude Favet, professeur de biologie au Lycée Val-de-Durance, à Pertuis. Merci à vous car vous avez grandement contribué à mon goût pour les études.



Je remercie 'Nostalgie', 'TSF Jazz', Miss Kittin et Ellen Alien pour avoir accompagné en musique l'écriture de cette thèse, ainsi que les vigiles anonymes que l'on croise tard le soir et qui sont encore là quand on s'en va..

Je remercie Guillaume Charpentier aka 'Halloween', pour m'avoir bien fait rire lors de ses venues sur Paris. Guillaume, tu es un peu mon petit frère et tu seras toujours le bienvenu chez moi.

Je remercie mes grand-parents de Villelaure, Josette et Albin, et Riri bien sûr, pour leur soutien et tout simplement car je les aime et qu'ils m'ont permis d'être qui je suis.

Je remercie mes frères, Guillaume et Bruno (les jumeaux). Merci à tous les deux, je suis fier d'être votre frère. Merci de m'avoir soutenu durant toutes ces années d'études, merci d'être qui vous êtes. Guillaume, félicitations pour ton expérience londonienne, il fallait oser et tu l'as fait. Bruno, félicitations pour l'heureux évènement à venir, il fallait oser et tu l'as fait (!). Merci infiniment à mes deux frères.

Je remercie ma chère et tendre. Merci d'être qui tu es et de m'aider à être et à devenir. Merci mon amour pour ton soutien. Merci pour les bisous cookies et le reste. Merci Ninette. Merci ma future épouse. Merci Maude.

Je remercie enfin mes parents. Les mots ici ne suffisent pas, sachez simplement que je vous aime et que vous me servez d'exemple.

Merci papa pour tes sacrifices et m'avoir ainsi permis grâce à ton travail de me réaliser. Tu es un exemple pour moi. Tu es tout simplement mon père, le plus formidable et le plus courageux qui soit.

Enfin, merci maman. Tu m'as tout donné, et bien d'avantage. Merci maman pour avoir pédalé le jour de mon opération... J'espère continuer à te faire vivre en moi...comme tu m'as fait vivre depuis toi.

Je vous aime...

A ma mère,

# VIDEOS ISSUES DES EXPERIENCES D'IMAGERIE EN TEMPS-REEL

## Vidéos article 1

**Movie 2A** : cellules d'EGM exprimant la GFP en migration sur un tapis de cellules corticales non fluorescentes. Les cellules ont été filmées toutes les 3 minutes (objectif X20) pendant 100 minutes. Les translocations nucléaires sont précédées par la migration vers l'avant de matériel cytoplasmique initialement localisé autour du noyau.

**Movie 3A** : cellule d'EGM exprimant la GFP greffée dans le télencéphale basal d'une tranche de cerveau en migration dans la zone intermédiaire profonde du cortex. La tranche a été filmée toutes les 3 minutes (objectif X20) pendant 2 heures et 35 minutes. La migration est saltatoire. Chaque translocation nucléaire est précédée de la migration vers l'avant de matériel cytoplasmique qui forme un renflement à distance du noyau. La cellule produit de nouvelles branches neuritiques par division du cône de croissance principal.

**Movie 5B1** : cellule d'EGM exprimant la GFP en migration sur un tapis de cellules corticales non fluorescentes. Les cellules ont été filmées toutes les 3 minutes (objectif X40) pendant 5 heures et 33 minutes. L'application de blebbistatine à une concentration de 70 $\mu$ M a lieu à 20h35. Avant l'application de blebbistatine, le noyau subit deux translocations de forte amplitude. Après application, les translocations nucléaires disparaissent, un neurite se rétracte et des lamellipodes actifs se forment autour du noyau et au niveau de la bifurcation.

## Vidéo article 2

**Movie 1** : cellules d'EGM exprimant la GFP en migration sur un tapis de cellules corticales non fluorescentes. Les cellules ont été filmées toutes les 3 minutes (objectif X20) pendant 7 heures et 18 minutes. L'application de **nocodazole** à une concentration de 1 $\mu$ M a lieu à 19h28. Avant l'application, les cellules présentent le comportement migratoire caractéristique des cellules d'EGM. Le nocodazole induit une rétraction des neurites et une perte de la polarité des cellules, qui adoptent alors un comportement migratoire de type multipolaire.

## Vidéos article 4

Cellules d'EGM exprimant la GFP en migration sur un tapis de cellules corticales non fluorescentes. Objectif X20.

**Movie 1** : La cellule a été filmée toutes les 3 minutes pendant 12 heures et 8 minutes. La vidéo débute au temps 00h00min. L'application de nocodazole à une concentration de 100nM a lieu à 1h02. L'application d'un mélange de **nocodazole** à une concentration de 100nM et de **blebbistatine** à une concentration de 20 $\mu$ M a lieu à 3h40.

**Movie 2** : Les cellules ont été filmées toutes les 3 minutes (1 plan sur 2 conservé dans la vidéo) pendant 12 heures et 27 minutes. La vidéo débute au temps 00h00min. L'application de **nocodazole** à une concentration de 100nM a lieu à 1h22. L'application d'un mélange de **nocodazole** à une concentration de 100nM et de **blebbistatine** à une concentration de 20 $\mu$ M a lieu à 5h44.

(Movie1 et Movie2 réalisés dans la même expérience).

**Movie 3 :** « The Looping-cell ». Les cellules ont été filmées toutes les 3 minutes pendant 15 heures et 58 minutes. L'application de **nocodazole** à une concentration de 100nM a lieu à 15h24. L'application d'un mélange de **nocodazole** à une concentration de 100nM et d'**Y27632** à une concentration de 100μM a lieu à 19h13.

**Movie 4 :** Les cellules ont été filmées toutes les 3 minutes pendant 19 heures et 18 minutes. L'application de **nocodazole** à une concentration de 100nM a lieu à 19h37. L'application d'un mélange de **nocodazole** à une concentration de 100nM et d'**Y27632** à une concentration de 100μM a lieu à 23h51.

(Movie3 et Movie4 réalisés dans deux expériences distinctes).

**Movie 5 et Movie 6 :** Les cellules ont été filmées toutes les 3 minutes pendant 16heures et 11 minutes. L'application de **blebbistatine** à une concentration de 20μM a lieu à 18h35.

(Movie5 et Movie6 réalisés dans la même expérience).

**Movie 7 et Movie 8 :** Les cellules ont été filmées toutes les 4 minutes pendant 17heures et 24 minutes. L'application d'**Y27632** à une concentration de 100μM a lieu à 17h35. On peut apercevoir le tapis d'axones corticaux au début des films.

(Movie7 et Movie8 réalisés dans la même expérience).

**Movie 9 et Movie 10 :** Les cellules ont été filmées toutes les 3 minutes pendant 10heures et 31 minutes. L'application d'un mélange d'**ortho-vanadate de sodium** à une concentration de 100μM et de **blebbistatine** à une concentration de 20μM a lieu à 20h10.

(Movie9 et Movie10 réalisés dans la même expérience).

**Movie 11 et Movie 12 :** Les cellules ont été filmées toutes les 3 minutes pendant 19heures et 27 minutes. L'application d'**ortho-vanadate de sodium** à une concentration de 100μM a lieu à 20h18.

(Movie11 et Movie12 réalisés dans la même expérience).

**Movie 13 et Movie 14 :** Les cellules ont été filmées toutes les 4 minutes pendant 15heures et 58 minutes. L'application de **taxol** à une concentration de 1μM a lieu à 15h50.

(Movie13 et Movie14 réalisés dans la même expérience).

## Vidéos Etude TTL

**Movie1 :** cellules d'EGM **TTL+/+** exprimant la GFP en migration sur un tapis d'axones corticaux non fluorescents. Les cellules ont été filmées toutes les 5 minutes (objectif X20) pendant 13heures et 59 minutes.

**Movie2 :** cellules d'EGM **TTL+/-** exprimant la GFP en migration sur un tapis d'axones corticaux non fluorescents. Les cellules ont été filmées toutes les 5 minutes (objectif X20) pendant 13heures et 59 minutes.

**Movie3 :** Cellules d'EGM **TTL-/-** exprimant la GFP en migration sur un tapis d'axones corticaux non fluorescents. Les cellules ont été filmées toutes les 5 minutes (objectif X20) pendant 13heures et 59 minutes.

(Movie1, Movie2 et Movie3 réalisés dans la même expérience).



# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b>	p12
<b>I DEVELOPPEMENT DU CORTEX CEREBRAL</b>	p13
Préambule : les neurones corticaux	p13
<u>1 Spécification des neurones corticaux au cours des étapes précoces de la neurogenèse corticale</u>	p14
1.1 Le tube neural	p14
1.2 Régionalisation anatomique dorso-ventrale du télencéphale	p15
1.3 Contrôle de la régionalisation du télencéphale : les centres organisateurs	p15
1.4 Régionalisation du télencéphale et spécification des interneurons	p17
1.5 Genèse des sous-types d'interneurones corticaux	p19
<u>2. Développement précoce du néocortex</u>	p21
2.1 Prolifération dans le neuroépithélium cortical	p21
a- Le neuroépithélium	p21
b- Mécanismes cellulaires de la migration des progéniteurs neuronaux	p22
c- Influence des facteurs extrinsèques sur la prolifération neuronale	p23
2.2 Etapes précoces de la corticogenèse et premiers neurones	p24
<u>3 La migration neuronale</u>	p25
3.1 Historique de la migration radiale	p26
3.2 Historique de la migration tangentielle	p27
3.3 Comportements migratoires des neurones dans le cortex en développement	p29
3.3.1 Les différents modes de migration radiale	p29
a- La locomotion	p29
b- La translocation somatique	p30
c- La migration multipolaire	p31
3.3.2 Les différentes phases de la migration radiale aux stades tardifs du développement cortical	p31
3.3.3 Le mode de migration tangentiel	p32
a- Morphologie bipolaire branchée	p32
b- Nucléokinèse saltatoire des interneurons corticaux	p33
3.4 Les mouvements antérogrades du centrosome et le découplage noyau-centrosome dans les neurones en migration	p34
3.5 Les voies de migration tangentielle dans le télencéphale embryonnaire	p36
3.6 Molécules de guidage dans les interneurons corticaux en migration	p38
3.6.1 Facteurs de contact permissifs	p38
3.6.2 Facteurs attractifs	p38
3.6.3 Facteurs répulsifs	p41
3.6.4 Cas particulier des neurotransmetteurs	p41

<b>II MECANISMES DE LA MIGRATION NEURONALE</b>	p42
<u>1 Généralités sur la migration cellulaire et originalité de la migration neuronale</u>	
<u>2 Le cytosquelette</u>	p43
2.1 Le cytosquelette d'actine	p43
2.1.1 Structure et rôle des filaments d'actine	p43
2.1.2 La myosine	p46
a- Structure et fonction	p46
b- Régulation de la myosine	p49
b1- Phosphorylation des Chaînes Lourdes régulatrices	p49
b2- Déphosphorylation des Chaînes Lourdes régulatrices	p50
c- Rôle des myosines non-musculaires IIa et IIb dans la migration cellulaire	p50
2.1.3 Contrôle du cytosquelette d'acto-myosine par les Rho-GTPases durant la migration cellulaire	p52
2.2 Les filaments intermédiaires	p54
2.2.1 Classification et structure des filaments intermédiaires	p54
2.2.2 Rôle des filaments intermédiaires	p54
2.3 Les microtubules	p56
2.3.1 Structure des microtubules	p56
2.3.2 Modifications post-traductionnelles de la tubuline	p57
a- Acétylation, palmitoylation, polyglycylation et phosphorylation	p57
b- Le cycle de détyrosination-tyrosination	p57
c- Polyglutamylatation	p58
2.3.3 Agents pharmacologiques ciblant les microtubules	p58
a- Les drogues qui déstabilisent les microtubules : colchicine, vinblastine et nocodazole	p58
b- Le taxol : une drogue qui stabilise les microtubules	p59
2.3.4 Les moteurs moléculaires	p60
a- La dynéine	p60
b- Les kinésines	p61
2.3.5 Le centrosome	p62
a- Structure du centrosome	p62
b- Nucléation et ancrage des microtubules	p62
c- Historique et rôle du centrosome	p64
2.3.6 Le corps basal et le cil	p65
a- Structure d'un corps basal, d'un cil et ciliogénèse	p65
b- Le cycle cellulaire et le cil primaire	p67
c- Les ciliopathies	p68
d- Le cil primaire des neurones	p69
<u>3 Organisation des microtubules dans les neurones en migration</u>	p69
<u>4 Le couplage entre le noyau et le centrosome dans les neurones en migration et son contrôle</u>	p71

4.1 Mise en évidence d'un couplage physique entre le noyau et le centrosome	p71
4.2 Protéines associées aux microtubules impliquées dans le couplage noyau-centrosome	p72
4.2.1 Dcx	p72
4.2.2 Le complexe Lis1-Ndel1-dynéine	p73
4.2.3 DISC1	p76
4.2.4 FAK	p76
<u>5 Positionnement du centrosome dans les cellules non-neuronales</u>	p77
5.1 Positionnement du centrosome dans une cellule au repos	p78
5.2 Positionnement du centrosome dans une cellule en migration	p79
5.2.1 Rôle des Rho-GTPases dans la capture et la stabilisation des microtubules au front de migration	p79
5.2.2 Rôle de la dynéine et de Lis1 dans la capture et l'ancrage des microtubules au cortex cellulaire du front de migration	p81
<u>6 Positionnement du centrosome à l'avant du noyau dans les neurones en migration</u>	p82
<u>7 La remise en cause actuelle du modèle classique de la nucléokinèse</u>	p83
<u>8 Le rôle de la dynéine et de Lis1 dans les mouvements du centrosome dans les neurones en migration</u>	p84
<u>9 Rôle de l'acto-myosine dans la migration neuronale</u>	p86
<u>10 Rôle de la signalisation dans le contrôle des cytosquelettes de microtubules et d'acto-myosine dans la migration neuronale</u>	p88
10.1 voies de signalisation qui contrôlent les microtubules	p88
10.1.1 CDK5	p88
10.1.2 STEF/Tiam1- Rac1- JNK	p88
10.2 Voies de signalisation qui contrôlent l'actine	p90
10.2.1 PAK3	p90
10.2.2 p27Kip1	p90
10.2.3 Gα12/13	p91
10.2.4 RhoA-ROCK1/2	p91
<u>11 Les défauts de la migration neuronale chez l'homme et les protéines impliquées</u>	p92
11.1 Lissencéphalie de type I et protéines Dcx et Lis1	p92
11.2 Dyslexie	p93
11.3 L'hétérotopie péri-ventriculaire et la FilamineA	p93
11.4 La pachygyrie et le rôle de la Reelin	p94
11.5 Syndrome de Zellweger	p96

<b>RESULTATS</b>	p97
<b>Article1</b> : remaniements morphologiques du centrosome et de l'appareil de Golgi et rôle de l'acto-myosine dans les interneurons corticaux en migration	p98
<b>Article2</b> : rôle des microtubules dans la migration des interneurons corticaux	p100
<b>Article3</b> : organisation des microtubules et ultrastructure du centrosome dans les interneurons corticaux en migration	p102
<b>Article4</b> : contrôle du couplage entre le noyau et le complexe centrosome/appareil de Golgi dans les interneurons corticaux en migration	p104
Etude du rôle de la mutation de la Tubulin Tyrosine-Ligase (TTL) sur la migration des interneurons corticaux	p114
<b>DISCUSSION</b>	p116
I Rôles des microtubules dans la migration des interneurons corticaux	p117
II Rôles de la myosine II et de la voie Rho dans la migration des interneurons corticaux	p119
III Les interneurons corticaux en migration sont-ils sortis du cycle cellulaire	p120
IV Les rôles possibles du cil primaire dans les interneurons corticaux en migration	p122
V Migration, ancrage du corps basal et polarité dans les interneurons corticaux en migration	p125
<b>ANNEXES</b>	p128
<b>Article C.Kappeler</b> : étude du rôle de la protéine Dcx dans la migration des interneurons corticaux.	
<b>Revue</b> : mécanismes cellulaires et moléculaires de la migration des interneurons corticaux.	
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	p129



"The cell is always speaking--the secret is to learn its language"  
(Dr. A.S. Bajer to C. L. Rieder as the latter was starting his graduate work in 1972).



## ***INTRODUCTION***

# I DEVELOPPEMENT DU CORTEX CEREBRAL

## Préambule : Les neurones corticaux

Le fonctionnement du cortex cérébral requiert l'activité de deux classes de neurones :

- des neurones de projection, excitateurs (environ 75% des neurones) et
- des neurones inhibiteurs ou interneurons (environ 25% des neurones).

Le neurotransmetteur principal des neurones excitateurs est le glutamate, celui des interneurons le GABA (pour  $\gamma$ -Amino Butyric Acid). Les neurones excitateurs projettent à grande distance et forment les différentes couches du cortex cérébral. Les interneurons projettent localement et sont disséminés dans tout le cortex, sans apparente organisation précise. Leur soma est plus petit que celui des neurones excitateurs.

Les neurones pyramidaux sont traditionnellement considérés comme la clé de voûte du cortex, alors que les interneurons ont longtemps été considérés comme jouant un rôle accessoire, comme celui de prévenir les crises d'épilepsie générées par l'excitation des neurones pyramidaux. Mais de nombreux chercheurs, dont le premier fut Ramón Y Cajal, se sont penchés sur les interneurons et les ont considérés comme responsables de la richesse du fonctionnement du cortex. Selon les propres mots de Cajal, les interneurons sont les « papillons de l'âme » (Ramón y Cajal, 1923 dans Yuste 2005). Cajal décrivait aussi les interneurons comme des « neurones aux petits axones ». Ainsi, il écrivait :

*« ...L'opinion généralement acceptée qu'à l'heure actuelle la seule différence entre le cerveau des chats, des chiens ou des singes et celui de l'homme n'est que quantitative est un peu offensante pour la dignité humaine. Mais l'existence du langage, notre capacité d'abstraction et à élaborer des concepts, et, finalement notre art à l'invention de nouveaux outils, ne laisseraient-ils pas envisager l'existence de ressources originales, ou de quelque-chose de qualitativement nouveau, qui justifie la psychologie fine de l'homo-sapiens ? Mes recherches ont montré que la supériorité du cerveau humain est intimement liée à la prodigieuse abondance et variabilité de formes des neurones à petit axone. »*

S.Rámon y Cajal, Recuerdos de mi vida, 1917.

Les interneurons jouent un rôle crucial dans le traitement de l'information corticale, la modulation des sorties corticales et dans la plasticité du réseau cortical (Whittington et al. 2003, Wang et al. 2004). Les interneurons corticaux présentent une très grande diversité de sous-types, ce qui suggère qu'ils assurent des fonctions nombreuses et variées.

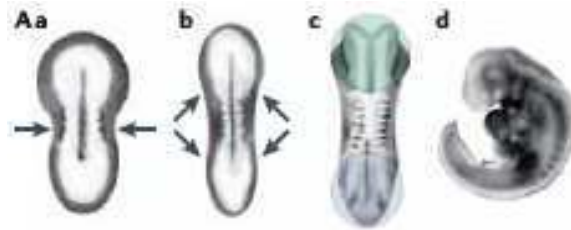
Les interneurons ont ainsi été caractérisés suivant plusieurs critères : 1) leur morphologie (Ramon y Cajal 1911 ; Lund et Lewis 1993) (2) leur neurochimie (DeFelipe 1993 ; Gonchar et Burkhalter 1997) 3) leur connectivité et 4) leurs propriétés électrophysiologiques, notamment l'expression de canaux ioniques particuliers (Cauli et al. 1997 ; Kawaguchi et Kubota 1997 ; pour revue Markram et al. 2004).

Les processus qui conduisent à la lamination de la structure corticale adulte sont très complexes et peuvent parfois subir des dérèglements, conduisant à des anomalies plus ou moins visibles du cortex et des pathologies plus ou moins graves, comme l'épilepsie et le retard mental.

# 1 Spécification des neurones corticaux au cours des étapes précoces de la neurogenèse corticale

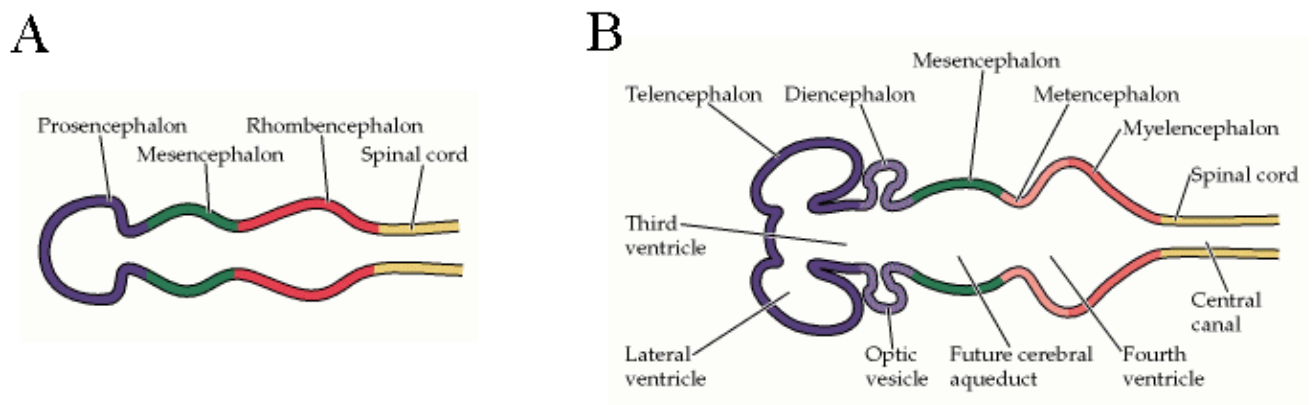
## 1.1 Le tube neural

Le système nerveux des vertébrés se forme à la fin de la gastrulation, lors de la neurulation. La ligne médiane de l'ectoderme s'épaissit, forme la plaque neurale, qui s'invagine pour former le tube neural (Fig.1). Le tube neural, constitué de cellules neuroépithéliales, donnera le système nerveux central.



**Fig1. Fermeture du tube neural pendant le développement de la souris.** (a-c vues dorsales, d vue latérale) a-c : fusion du tube neural. d : vue d'un tube neural fermé. Des défauts de fermeture du tube neural postérieur se traduisent par une *spina bifida*. Des défauts de fermeture du tube neural antérieur se traduisent par une anencéphalie. (Blom et al. 2006)

La partie rostrale du tube neural se divise en trois vésicules : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale (de la plus rostrale à la plus caudale, Fig.2).



**Fig.2 Régionalisation rostro-caudale du tube neural, en 3 (A) puis 5 (B) vésicules.**  
Tiré de Purves et al., *Neuroscience*, Sinauer Editions.

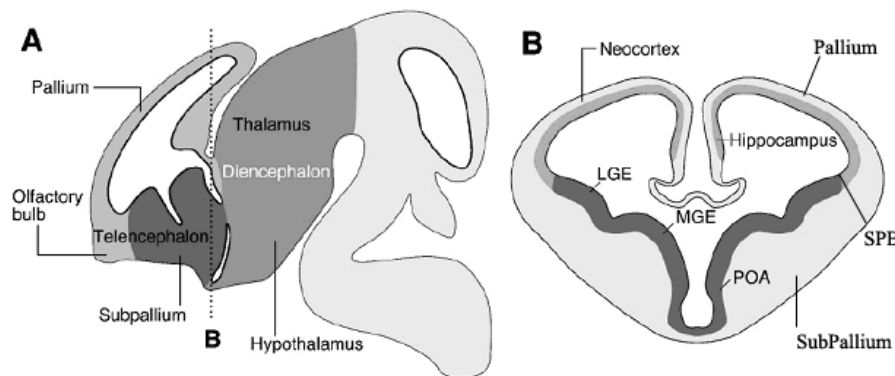
Après la neurulation, au 8<sup>ème</sup> jour embryonnaire chez la souris (E8), cinq vésicules se forment, par division du prosencéphale en télencéphale et diencéphale, et division du rhombencéphale en métencéphale et myélencéphale (Figure 2). Le télencéphale est constitué de deux vésicules symétriques bien visibles à E12 (Figure 2) qui formeront les hémisphères cérébraux. Les vésicules sont recouvertes des méninges, dont le feuillet le plus interne est la pie-mère. La lumière du tube neural forme les ventricules, remplis de liquide céphalo-rachidien. Ainsi chaque vésicule présente une face ventriculaire interne et une face piaie superficielle.

## 1.2 Régionalisation anatomique dorso-ventrale du télencéphale

Au cours du développement, le télencéphale comprend deux grandes régions anatomiquement distinctes (Fig.3):

- 1) une fine région dorsale, le pallium, constituée d'un épithélium prolifératif recouvert aux stades précoces de la neurogenèse d'une étroite bande de neurones post-mitotiques;
- 2) une région basale beaucoup plus épaisse, le sub-pallium, contenant un épithélium prolifératif recouvert d'un important manteau cellulaire.

Au niveau de la face ventriculaire, on trouve d'importantes protubérances qui font saillie dans le ventricule : les éminences ganglionnaires.



**Fig.3 Organisation anatomique du cerveau antérieur en développement.**

A- Section sagittale d'un cerveau d'embryon de souris à E12.

B- Schéma d'une section transverse du télencéphale d'un embryon de souris à E12.

LGE : Eminence Ganglionnaire Latérale ; MGE : Eminence Ganglionnaire Médiale ; POA : Aire Pré-Optique. SPB : frontière pallium/subpallium (Subpallium/Pallium Boundary).

(Marin et Rubenstein 2003)

Le pallium se divise en quatre régions :

- le pallium médian, proche du plexus choroïde, qui donnera l'hippocampe ;
- le pallium dorsal, ébauche du néocortex ;
- le pallium latéral, qui contient principalement le futur cortex entorhinal et olfactif, et une partie de l'amygdale ;
- le pallium ventral, dont dérivent le claustrum et la majorité de l'amygdale (Puelles et al. 2000).

Les éminences ganglionnaires du sub-pallium sont divisées en :

- éminence ganglionnaire médiane (EGM, ébauche du pallidum),
- latérale (EGL, ébauche du striatum) et
- caudale (EGC).

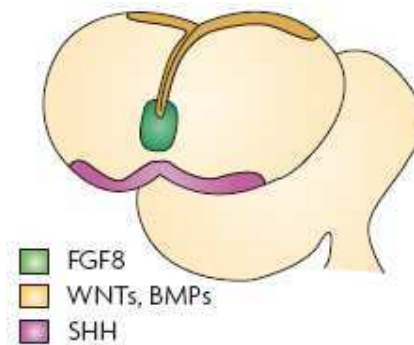
## 1.3 Contrôle de la régionalisation du télencéphale : les centres organisateurs

L'agencement des différentes structures du télencéphale sur les axes ventro-dorsal et rostro-caudal est contrôlé par 3 centres organisateurs. Ces centres organisateurs sont des régions anatomiquement distinctes, qui sécrètent des molécules signalisatrices spécifiques dans le tissu cérébral. Ces molécules sont des morphogènes qui se distribuent en gradients à partir des centres organisateurs et induisent dans leurs cellules cibles, en fonction de leur concentration, l'expression de facteurs de transcription précis. L'expression de ces facteurs de transcription contrôle l'engagement des cellules dans une voie de différenciation particulière, et la

formation de structures fonctionnellement distinctes (Schuurmans et Guillemot 2002 ; Manuel et al. 2006).

Les centres organisateurs (Fig.4) contrôlent la régionalisation dorso-ventrale anatomique et fonctionnelle du télencéphale. On distingue :

- 1) le bourrelet neural antérieur (Anterior Neural Ridge ANR) (Shimamura et Rubenstein 1997 ; Houart et al. 1998),
- 2) l'hème cortical (partie médiale du cortex) (Campbell 03),
- 3) le mésoderme préchordal organisé en deux structures ventrales bilatérales (Campbell 03).



**Fig.4 Centres organisateurs du télencéphale embryonnaire.**  
(Dehay et al. 2007)

Chacun de ces centres organisateurs sécrète des morphogènes spécifiques :

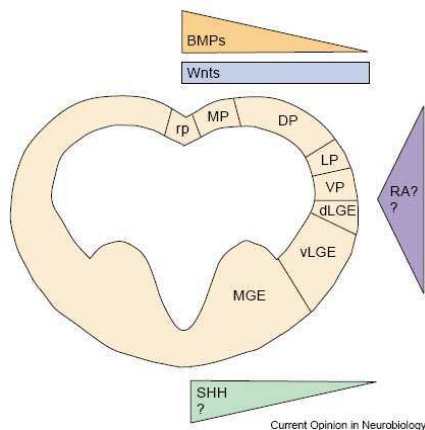
- 1) le bourrelet neural antérieur sécrète des FGFs (Fibroblast Growth Factor), en particulier du Fgf8.
- 2) L'hème cortical sécrète des morphogènes induisant les structures dorsales du télencéphale qui appartiennent aux familles des WNTs (Wingless/Int-1), des BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) et du TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ). Ce centre organisateur induit le développement des structures corticales dorsales et de l'hippocampe (Lee et al. 2000 ; Ragsdale et al. 2001 ; Monuki et al. 2001). Les BMPs sont surtout exprimées dans les régions dorso-médianes du télencéphale. Les Wnts qui sont exprimés dans tout le pallium pourraient jouer un rôle de dorsalisation plus large que celui des BMPs.
- 3) Le mésoderme préchordal sécrète Sonic hedgehog (Shh) qui régionalise ventralement le télencéphale (Sander et al. 2000) et contrôle le développement des éminences ganglionnaires (Chiang et al. 1996 ; Muenke et Beachy 2000).

L'élimination de la voie Shh entraîne une dorsalisation du télencéphale ventral (Chiang et al. 1996), et sa surexpression provoque une expansion dorsale de l'expression des gènes contrôlés par Shh (Goodrich et al. 1997). Shh contrôle l'expression de facteurs de transcriptions de la famille Gli (Ruiz I Altaba 1999 ; Ruiz I Altaba et al. 2002 ; Bai et al. 2004). Les facteurs de transcription Gli1 et Gli2 stimulent l'expression de gènes de spécification ventrale en réponse à Shh. En revanche, le facteur de transcription Gli3, qui normalement devrait lui aussi stimuler une spécification ventrale, est clivé pour former une forme répressive de Shh, qui stimule des gènes de spécification dorsale (Ruiz I Altaba 1998 ; Tole et al. 2000 ; Wang et al. 2000). Des signaux latéraux comme l'acide rétinoïque (AR) participent à une régionalisation latérale intermédiaire du télencéphale. L'AR est sécrété précocement par l'ectoderme superficiel rostral-latéral, au niveau des vésicules optiques, puis



selon un gradient 'inside-out' au niveau du neuroépithélium des éminences ganglionnaires et enfin au niveau des méninges, avec un gradient inversé 'out-inside' (Smith 2001).

Les gradients de morphogènes se chevauchent et ont des actions antagonistes, qui délimitent les frontières entre les différents territoires du télencéphale (Fig.5). Par exemple, les voies de signalisation Shh et Bmp se chevauchent et la voie Bmp semble limiter l'activité ventralisante de Shh (Briscoe et al. 2001).



**Fig.5 Signaux extrinsèques qui établissent les différents domaines de progéniteurs le long de l'axe dorso-ventral dans le télencéphale de souris au 10ème jour embryonnaire (E10).**

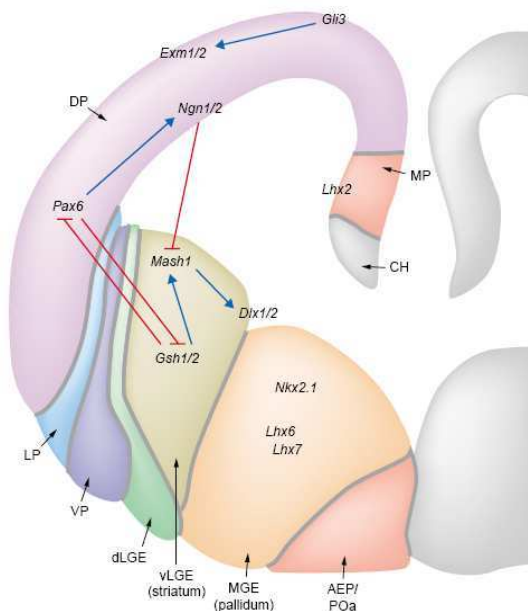
dLGE : EGL dorsale ; DP : Pallium dorsal ;  
 LP : Pallium latéral ; MP : Pallium médian ;  
 rp : plaque du plancher ; vLGE : EGL ventrale ;  
 VP : pallium ventral.  
 (Campbell 2003)

#### 1.4 Régionalisation moléculaire du télencéphale et spécification des interneurons.

Le chevauchement des morphogènes sécrétés induit un chevauchement de l'expression de facteurs de transcription, dont les combinaisons régionalisent le télencéphale et spécifient des zones progénitrices distinctes (Fig.6). Ces combinaisons aboutissent à l'établissement d'un territoire dorsal, le pallium, et d'un territoire basal, le sub-pallium. A chaque territoire va correspondre un type neuronal spécifique : le pallium est spécifié pour générer des neurones excitateurs, le sub-pallium est spécifié pour générer des interneurons (pour revue Campbell 2003). Au niveau du télencéphale dorsal, les BMPs et les WNTs induisent l'expression de différents facteurs de transcription dont Pax6, Lhx2, Emx1/2, Ngn1/2 et Tbr1/2. Dans le télencéphale basal, Shh régionalise le sub-pallium et induit les facteurs de transcription Six3, Nkx2.1, Gsh2, Dlx1/2 et Mash1 qui spécifient les progéniteurs en neurones GABAergiques.

L'expression de facteurs de transcription antagonistes dans le télencéphale dorsal et ventral permet de mettre en place une frontière entre le pallium et le subpallium. Par exemple, Pax6 est un facteur de transcription à homéodomaine exprimé dans le télencéphale dorsal qui inhibe l'expression de Gsh2, exprimé par le sub-pallium (Manuel et al. 2005). Ainsi les souris mutantes pour Pax6 expriment des gènes du subpallium dans le pallium ventral (Stoykova et al. 2000 ; Toresson et al. 2000 ; Yun et al. 2001) et des gènes spécifiques de l'EGL dans l'EGL (Stoykova et al. 2000). L'action antagoniste entre Pax6 et Nkx2.1 d'établir une frontière dans le sub-pallium même, entre l'EGL et l'EGL (Fode 2000 ; Muzio et al 2002 ; Schuurmans et Guillemot 2002). Les facteurs de transcription pro-neuraux de type bHLH (basic Helix-Loop-Helix) sont aussi très importants pour spécifier la frontière pallium/sub-pallium. Chez les animaux mutants pour Ngn2 (Neurogénine 2) ou Ngn2/Ngn1 normalement restreints au télencéphale dorsal, il y a induction ectopique de marqueurs ventraux comme Mash1 dans le cortex. Les gènes de la famille de la Neurogénine stimulent le développement du télencéphale dorsal en inhibant l'expression de Mash1 (Casarosa et al. 1999 ; Fode et al. 2000).

Les éminences ganglionnaires expriment des facteurs de transcription spécifiques. Les éminences ganglionnaires médiane et latérale expriment les facteurs de transcription *Dlx1/2*, qui leur confèrent la potentialité de générer des neurones GABAergiques: les souris mutantes pour *Dlx1* et *Dlx2* (exprimés dans l'EGM et l'EGL) présentent une réduction sévère de la proportion d'interneurones corticaux issus du télencéphale basal (Anderson et al. 1997a. Anderson et al. 1997b ; Bulfone et al. 1998), et des expériences de gain de fonction montrent que l'expression des GADs (Glutamate Decarboxylases), enzymes de synthèse du GABA, est contrôlée par les gènes *Dlx1/2* (Stuhmer et al. 2002). Le télencéphale basal exprime aussi *Mash1*, facteur de transcription pro-neural de type bHLH très important pour spécifier le devenir des interneurones corticaux. En effet, *Mash1* est nécessaire et suffisant pour conférer une identité ventrale aux neurones corticaux quand il est exprimé de façon ectopique. Chez le mutant *Mash1*, il y a une forte réduction du nombre des interneurones corticaux (Casarosa et al. 1999 ; Fode et al. 2000). *Gsh2* (Genomic-Screen homeobox 2) est un facteur de transcription à homéodomaine exprimé dans l'EGM et surtout dans l'EGL au niveau de son domaine dorsal. Chez des animaux mutés pour *Gsh2*, on assiste à une expression ectopique de marqueurs palliaux dans l'EGL, c'est-à-dire une dorsalisation de cette région (Corbin et al. 2000 ; Toresson et al. 2000 ; Yun et al. 2001 ; Corbin et al. 2003).



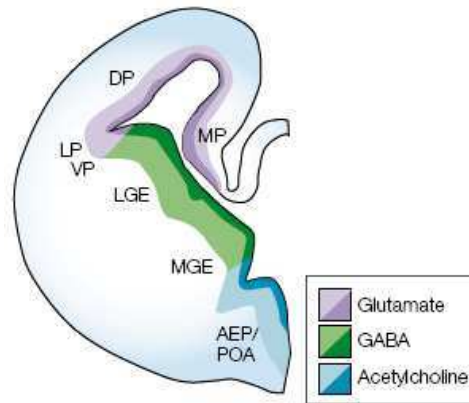
**Fig.6 Interactions génétiques sous-tendant la régionalisation du télencéphale.**

Schéma d'une section coronale à E12,5 qui montre les domaines dorsal et ventral et les profils d'expression des gènes précoces dans ces domaines.

*Six3* (Sine Oculis Homolog 3), facteur de transcription à homéodomaine, confère la potentialité au télencéphale basal de répondre à *Shh* en induisant l'expression de *Nkx2.1* (Oliver et al. 1995). *Nkx2.1* agit en régionalisant l'EGM et la partie la plus ventrale de la région préoptique (AEP) (Sussel et al. 1999). La mutation du gène *Nkx2.1* entraîne des défauts de spécification de l'EGM (qui adopte alors une identité d'EGL), et élimine complètement les neurones cholinergiques du télencéphale basal : les mutants *Nkx2.1* présentent une dorsalisation du télencéphale basal (Sussel et al. 1999 ; Marin et al. 2000). *Vax1* est un facteur de transcription à homéodomaine qui permet la formation du septum et contribue pour une part à la genèse des interneurones corticaux (non illustré) (Hallonet et al. 1998 ; Tagliatalata et al. 2004).

(*Shuurmans et Guillemot. 2002*)

La régionalisation du télencéphale engendre la spécification de deux territoires prolifératifs distincts dorsal et ventral, qui vont générer respectivement des neurones excitateurs glutamatergiques et des interneurones GABAergiques (Fig.7).

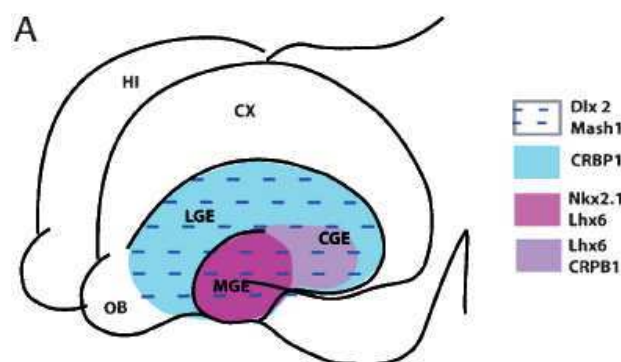


**Fig.7 Les territoires prolifératifs du télencéphale embryonnaire.**  
(Marin et Rubenstein 2001)

Chez les rongeurs et le furet, le sub-pallium est la source principale d'interneurones corticaux, et, chez la souris, la région septale contribue aussi à l'apport d'interneurones dans le néocortex (Anderson et al. 1997 ; Parnavelas 2000 ; Marin et Rubenstein 2001 ; Wonders 2006). Néanmoins, des observations chez des souris invalidées pour des facteurs de transcription exprimés ventralement (Gulasci et Lillien 2003 ; He et al. 2001) suggèrent que des interneurones pourraient aussi être générés dans le télencéphale dorsal. Cette capacité du télencéphale dorsal des rongeurs à générer des interneurones a été observée in vitro sur tranches organotypiques (Bellion et Métin 2005) mais reste encore à élucider. Chez l'embryon humain, l'origine des interneurones corticaux est différente de celle des rongeurs ou du furet : les interneurones corticaux, comme les neurones excitateurs, ont plutôt une origine palliale (Letinic et al. 2002).

### 1.5 Genèse des sous-types d'interneurones corticaux

Les interneurones sont générés au niveau des éminences ganglionnaires, mais, au sein même des éminences ganglionnaires, on retrouve une combinatoire de facteurs de transcription qui permet la production des divers sous-types d'interneurones (Fig.8).



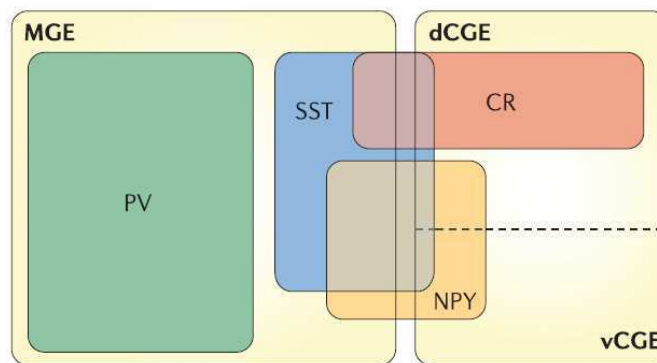
**Fig.8 Zones d'origine des interneurones dans les éminences ganglionnaires.**

L'éminence ganglionnaire (GE) du sub-pallium est sub-divisée en 3 régions : latérale (LGE), médiane (MGE) et caudale (CGE), selon le profil d'expression de divers facteurs de transcription (Dlx2, Mash1, NKX2.1 et Lhx6) et de la protéine CRBP1 (Cellular retinol-binding protein 1, Nery et al. 2002) (Métin et al. 2006).

L'EGM génère surtout des interneurones à Somatostatine (STT) et à Neuropeptide Y (NY) dans sa région dorsale, et à Parvalbumine (PV) dans sa région ventrale (Wonders et al. 2007 ;



Fig.9). Cette régionalisation de l'EGL est due à une expression différentielle de facteurs de transcription dans les domaines dorsal (Gli1, Hhip1, Nkx6.2, Gli2) et ventral (Zic3, Zic1, Sulf1, Lhx7) (Flames et al. 2007 ; Wonders et al. 2007). Hhip1 (Hedgehog Signaling Protein 1) et patched sont exprimés dans l'EGL dorsale et sont des inhibiteurs de la signalisation Shh (Loulier et al. 2005). L'inhibition de la signalisation Hedgehog par Hhip1 pourrait servir à établir un gradient de réponse à Shh dans l'EGL (Chuang et al. 2003 ; Saha et Schaffer 2006). La perte d'expression de Nkx2.1 dans l'EGL entraîne la perte des neurones à SST et à NPY (Anderson et al. 2001), et en aval de Nkx2.1, le facteur de transcription Lhx6 paraît nécessaire pour achever la spécification des interneurones à STT et à PV. L'EGL génère plutôt des interneurones à Neuropeptide Y et à Calréтинine (CR) (Wonders et al. 2007). L'EGL ne semble pas générer énormément d'interneurones (les interneurones à STT, à PV et à CR ne semblent pas provenir de cette région) (Xu et al. 2004 ; Liodis et al. 2007 ; Wonders et al. 2007). L'EGL et l'EGL expriment essentiellement les mêmes gènes, mais les mécanismes exacts de spécification de ces deux régions ne sont pas bien connus (Neri et al. 2002). Il semblerait que les gènes Dlx1 et Dlx2 puissent être responsables des différences de spécification entre ces deux régions (Xu et al.2004).



**Fig.9 Contribution relative de l'EGL et de l'EGL aux sous-types d'interneurones corticaux.**  
(Wonders 2007)

La spécification des sous-types d'interneurones se caractérise non seulement par une variabilité régionale mais aussi une évolution temporelle. En effet, les interneurones nés tôt au cours de la neurogenèse expriment préférentiellement le facteur de transcription Mash1, et les interneurones nés plus tardivement expriment plutôt les gènes Dlx1/2 (surtout, puis Dlx5/6 plus tard), Lhx6 (dans le cortex et le striatum) et Lhx7 (cellules cholinergiques du striatum)(Marin et Rubenstein 2001). Cette différence temporelle d'expression pourrait participer à la genèse de sous-types différents d'interneurones au cours du temps et à leur spécification pour des destinations distinctes.

La spécification des interneurones est-elle fixée irrévocablement dès la phase de prolifération ou bien des facteurs épigénétiques peuvent-ils influencer la différenciation des interneurones, en particulier leur phase de migration ?

La question n'est pas résolue. Les progéniteurs d'interneurones dérivés de l'EGL qui se différencient directement dans leur cible (Xu et al. 2004), sans migration à travers le cortex, ou bien après une phase de migration pendant laquelle ils subissent l'influence de facteurs extrinsèques (Butt et al. 2005), se différencient de la même manière. Ainsi, il semblerait que la spécification des interneurones issus de l'EGL soit établie dès la phase de prolifération, grâce à l'expression régionalisée de facteurs de transcription dans l'EGL, et non « en chemin » vers le cortex.

## **2. Développement précoce du néocortex**

### **2.1 Prolifération dans le neuroepithelium cortical**

#### **a- Le neuroépithélium**

Le neuroépithélium germinatif est un épithélium pseudo-stratifié qui borde la paroi des ventricules latéraux. Le neuroépithélium est polarisé le long de son axe apico-basal : des jonctions adhérentes sub-apicales isolent la membrane apicale, située au niveau de la surface ventriculaire, du domaine latéro-basal, et maintiennent l'intégrité du neuroépithélium (Huttner et al. 1997 ; Götz et Huttner 2005).

Une phase initiale de prolifération du neuroépithélium voit le pool de progéniteurs se multiplier de façon exponentielle par des divisions symétriques (divisions P-P) successives. Pendant cette phase précoce les cellules neuroépithéliales génèrent aussi les premiers neurones qui iront former la préplaque. Le tube neural entre ensuite dans une phase neurogénique pendant laquelle les cellules neuroépithéliales donnent naissance à deux autres populations de cellules progénitrices vers E12-E13: (1) les cellules de glie radiaire et (2) les progéniteurs basaux (ou intermédiaires, ou aventriculaires ou petits précurseurs suivant les auteurs ; Haubensak et al. 2004 ; Miyata et al. 2004 ; Noctor et al. 2004). Ces deux types de progéniteurs secondaires sont des cellules de type neuroépithélial et astroglial, et vont produire de grandes quantités de neurones (Guillemot 2005).

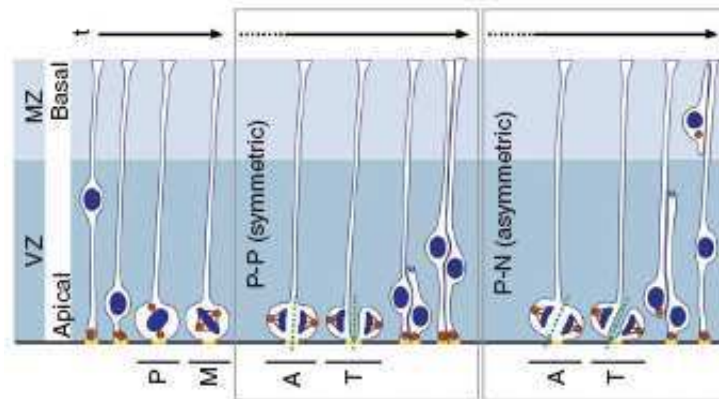
Les cellules de glie radiaire se divisent selon deux modes :

- asymétrique (division P-N), avec production d'une cellule de glie radiaire (division d'autorenouvellement) et d'un neurone ou d'un progéniteur basal ;
- symétrique terminal (division N-N) avec production de deux neurones (McConnell 1995 ; Rakic 1995 ; Huttner et Brand 1997 ; Götz et al. 2002 ; Fishell et Kriegstein 2003 ; Götz et Huttner 2005).

La division des progéniteurs basaux est toujours symétrique et donne le plus souvent naissance à deux neurones (sinon elle sert de mitose d'autorenouvellement) (Hausenback et al. 2004 ; Miyata et al. 2004 ; Noctor et al. 2004).

Les progéniteurs basaux vont peu à peu former la zone sous-ventriculaire (ZSV). Depuis peu émerge l'idée que les neurones issus des progéniteurs basaux formeraient la majorité des neurones corticaux des couches supra-granulaires (Hausenback et al. 2004 ; Miyata et al. 2004 ; Noctor et al. 2004), et qu'ainsi la ZSV fournirait beaucoup plus de neurones que la ZV. En effet, chez la souris, des mutations des gènes Pax6, Ngn2 et Id4 sont associées à des défauts du nombre des progéniteurs basaux et à une diminution de l'épaisseur du cortex (Pontious et al. 2008). Cette population pourrait permettre d'amplifier le stock de précurseurs en rajoutant un cycle de division, et l'augmentation de la taille de la ZSV semble corrélée avec l'augmentation de la taille du cortex dans la phylogénie (Smart 1973 ; Haubensak et al. 2004 ; Miyata et al. 2004 ; Noctor et al. 2004).

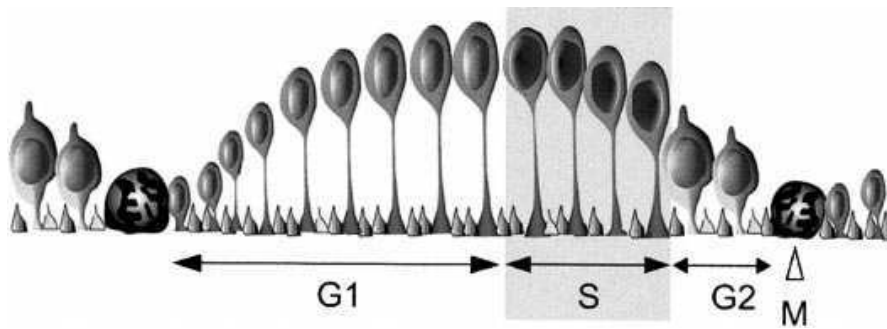
## b- Mécanismes cellulaires de la division des progéniteurs neuronaux



**Fig.10** Modèle proposé des relations entre l'orientation du fuseau mitotique et l'acquisition d'une identité, dans un schéma représentatif des mouvements nucléaires interkinétiques, lors de la division d'une cellule neuroépithéliale. De la prophase à l'anaphase, le noyau se trouve juste au-dessous de la membrane apicale. Ligne verte interrompue : plan de division ; ligne jaune : membrane apicale ; A Anaphase ; M Métaphase ; P Prophase ; T Télophase ; MZ Zone du Manteau ; VZ Zone Ventriculaire. (Morin et al. 2007)

On définit un axe apico-basal dans le neuroépithélium, selon l'axe apico-basal des cellules neuroépithéliales, avec i) une surface ventriculaire apicale et ii) une région basale située vers la surface piaie. Les cellules de glie radiaire et les cellules neuroépithéliales se divisent au contact de la surface ventriculaire apicale (Fig.10). Les progéniteurs basaux ont perdu leur attache ventriculaire et ceci leur permet d'aller se diviser à distance de la surface ventriculaire, d'abord dans la région basale de la zone ventriculaire à des stades précoces puis dans la ZSV à des stades plus tardifs (Guillemot 2005). Au niveau sub-cellulaire, les divisions symétriques et disymétriques corrént avec une orientation privilégiée du fuseau mitotique. En effet, dans les divisions symétriques (P-P), le fuseau mitotique est orienté perpendiculairement à l'axe apico-basal, et sépare la membrane apicale en deux domaines équivalents : les deux cellules-filles conservent alors une morphologie de type neuroépithélial (Kosodo et al. 2004 ; Huttner 2005). En revanche, une rotation du fuseau mitotique, de sorte qu'une des cellules-filles ne possède plus de membrane apicale, corrént avec les divisions asymétriques (P-N) : la cellule-fille qui hérite du domaine apical demeure de type neuroépithélial, la cellule-fille qui ne possède plus de domaine apical quitte la zone ventriculaire (Kosodo et al. 2004 ; Huttner 2005, voir Fig.10).

Lors du cycle cellulaire des progéniteurs, le noyau présente des mouvements stéréotypés selon l'axe apico-basal, par un processus qualifié de *migration nucléaire interkinétique* (voir Fig.11 ; Sauer 1935 ; Takahashi et al. 1993). Le noyau migre vers le domaine basal pendant la phase G1, y demeure pendant la phase S de synthèse d'ADN, puis revient à la face apicale lors de la phase G2, où a lieu la mitose. Avant le début de la neurogenèse, pendant la phase de multiplication du pool de progéniteurs, la migration nucléaire interkinétique des cellules neuroépithéliales se déroule sur toute la longueur de l'axe apico-basal de la cellule, qui s'étend de la zone ventriculaire jusqu'à la surface piaie. Ceci est rendu possible par la faible distance entre la surface ventriculaire et la surface piaie. Plus tard, quand le cortex s'épaissit et que les progéniteurs étendent un long processus apical et se transforment en cellules de glie radiaire, les noyaux continuent à subir les mêmes mouvements mais limités à la zone ventriculaire. Enfin, les progéniteurs basaux de la zone sub-ventriculaire qui ont perdu leur attache ventriculaire apicale n'effectuent que de petits (voire aucun) mouvement(s) nucléaire(s) interkinétique(s) entre les phases S et M.



**Fig.11 Le cycle de migration nucléaire inter-kinétique.**  
Tiré de Miyana et al. 2001.

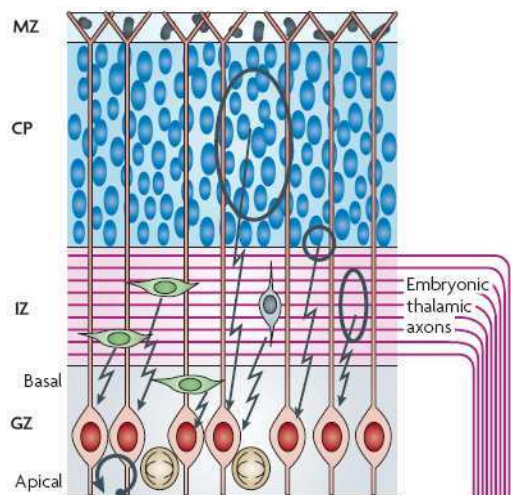
Des défauts de la polarisation des progéniteurs peuvent entraîner une réduction du nombre de neurones dans le cortex adulte, qui est alors beaucoup plus petit qu'un cortex normal : on parle de microcéphalie. Le rat porteur de la mutation *flathead* est atteint de microcéphalie. La mutation *flathead* (Cogswell et al. 1998) altère la citron-kinase, protéine associée à l'appareil de Golgi (Camera et al. 2003), et entraîne des défauts de positionnement du fuseau mitotique dans les progéniteurs et des défauts d'abscission des cellules-filles qui n'arrivent pas à se séparer (LoTurco et al. 2003). Ces défauts de séparation des cellules-filles induisent une importante mort cellulaire dans les zones prolifératives du cortex et des éminences ganglionnaires (Roberts et al. 2000 ; Mitchell et al. 2001 ; Sarkisian et al. 2001).

Enfin, le déroulement de la mitose influence les étapes ultérieures de la différenciation cellulaire. Dans des neurones qui se différencient en culture *in-vitro*, de nombreux neurites se forment après la dernière mitose, et seulement un seul devient un axone. L'équipe de CG Dotti a démontré que le neurite qui se différencie en axone est le neurite qui s'est formé en premier. La différenciation de ce neurite en axone nécessite le positionnement du centrosome et de l'appareil de Golgi à sa base. Or le positionnement de ces organites s'établit en fait dans le plan opposé à celui de la mitose. Le plan de la division mitotique polarise donc le neurone et détermine l'endroit où va se former le premier neurite qui deviendra un axone. Si les cellules possèdent plusieurs centrosomes, alors plusieurs axones sont formés. Ainsi, les mécanismes qui contrôlent l'orientation du fuseau mitotique lors de la mitose des précurseurs contrôlent probablement aussi la mise en place de la polarité neuronale (De Anda et al. 2005).

Récemment, il a été montré que Pax6 est impliqué dans le contrôle de la migration nucléaire interkinétique par l'intermédiaire du centrosome : Pax6 permettrait de stabiliser le centrosome au niveau apical dans les progéniteurs du neuroépithélium (Tamai et al. 2007).

### **c- Influence des facteurs extrinsèques sur la prolifération neuronale**

Plusieurs signaux extracellulaires, comme les facteurs de croissance et les neurotransmetteurs, sont impliqués dans la régulation de la prolifération dans le télencéphale en développement et jouent le rôle de facteurs trophiques (Fig.12 ; Dehay et Kennedy 2007). Ces molécules signalisatrices proviendraient de compartiments cellulaires différents du cortex en développement : neurones pyramidaux des couches profondes de la plaque corticale (CP, en bleu), neurones en migration dans la zone intermédiaire (ZI, cellules grises et vertes), axones thalamo-corticaux (magenta).

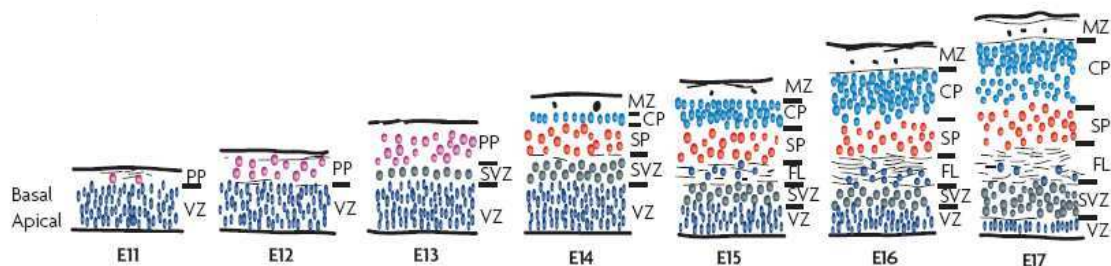


**Fig.12 Schéma illustrant les influences extrinsèques sur la prolifération des précurseurs corticaux et leur spécification.**  
(Dehay et Kennedy 2007)

Le GABA, présent de façon diffuse dans le neuroépithélium dès les stades précoces de la neurogenèse, influence la prolifération neuronale (Yan et al. 1992 ; Haydar et al. 2000). Le GABA inhibe, par une action autocrine, la prolifération des progéniteurs post-nataux de la ZSV qui possèdent des récepteurs de type GABA<sub>A</sub> et libèrent du GABA dans le milieu extracellulaire (Nguyen et al. 2003). En revanche dans la ZV corticale le GABA stimule la prolifération neuronale (Haydar et al. 2000), comme cela a été observé dans des cultures de progéniteurs du cervelet (Fiszman et al. 1999). Cet effet ne corrèle cependant pas avec une augmentation du nombre de neurones post-mitotiques corticaux. Ainsi le GABA exercerait des effets opposés sur la prolifération dans la ZSV et la ZV. Ces effets opposés sont cohérents avec l'effet global d'inhibition de la prolifération neuronale provoqué par le GABA (LoTurco et al. 1995), si l'on considère que c'est la ZSV et non la ZV qui fournit la majorité des neurones corticaux. Le GABA peut enfin aussi provenir des interneurones en migration et exercer un effet paracrine sur les progéniteurs. Les interneurones en migration sécrètent en effet du GABA qui contrôle leur migration et pourrait aussi contrôler la prolifération des progéniteurs rencontrés (Manent et al. 2005).

## 2.2 Etapes précoces de la corticogenèse et premiers neurones

Dans le télencéphale dorsal (pallium), les progéniteurs donnent naissance à de nouveaux précurseurs et à des neurones post-mitotiques qui migrent radialement, perpendiculairement à la surface corticale, pour former la plaque corticale. Des vagues de neurones vont se succéder pour former 6 couches, suivant une séquence qualifiée d'« inside-out » (intérieur-extérieur ; Fig.13). Les plus jeunes neurones se trouvent au niveau des couches externes du cortex, les plus vieux dans les couches les plus profondes (Angevine et Sidman 1961 ; Rakic 1974).



**Fig.13 Séquence de formation des couches corticales au cours de l'embryogenèse chez la souris.** (Dehay et al. 2006)

La neurogenèse embryonnaire dure 8 jours chez la souris, des jours E11 à E19, approximativement. Au départ, l'ébauche de cortex est formée d'une zone ventriculaire (ZV), constituée du seul neuroépithélium germinatif. Les premiers neurones qui quittent la zone proliférative ventriculaire forment la préplaque (PP) (encore appelée couche plexiforme primordiale). La seconde vague de neurones qui migrent dans le cortex forme la plaque corticale (PC), qui vient se positionner dans la PP et la divise en une zone marginale (ZM) superficielle et une sous-plaque (SP) inférieure. Les vagues suivantes de neurones gagnent la plaque corticale (futurs couches II à VI) (Marin-Padilla 1971 ; Smart et Smart 1977 ; Caviness 1982 ; Smart et al. 1982 ; Altman et Bayer 1990 ; Bayer et al. 1991).

Dès les stades précoces de la neurogenèse des neurones sont déjà présents dans la zone marginale et dans la préplaque. Parmi ces neurones très précoces, on trouve des neurones qualifiés de 'pionniers' et les neurones de Cajal-Retzius.

Les neurones pionniers, chez le rat, apparaissent au niveau des régions latérales des vésicules télencéphaliques dès E11. Ils couvrent tout le cortex à E12 et expriment fortement la calbindine et la calrétinine. Ils restent au niveau de la zone marginale après formation de la plaque corticale et émettent un axone corticofuge. Les neurones pionniers sont ainsi à l'origine des premières efférences corticales. Ils disparaîtront comme les cellules de Cajal-Retzius juste après la naissance (Meyer et al. 1998).

Les cellules de Cajal-Retzius apparaissent vers E10-E12, et sont localisées à la surface du cortex durant son développement pour contrôler sa mise en place (Marin-Padilla 1998). Après la période post-natale, 95% des cellules de Cajal-Retzius sont éliminées par mort cellulaire chez les rongeurs (Derer et Derer 1990 ; del Rio et al. 1995 ; Super et al. 1998) ou chez l'homme (Rakic et Zecevic 2000 ; Abraham et Meyer 2003 ; Abraham et al. 2004). Bien que les cellules de Cajal-Retzius expriment des facteurs de transcription spécifiques des zones prolifératives corticales (Tbr1, Emx1/2, Boncinelli et al. 2000 ; Hevner et al. 2001 ; Gorski et al. 2002), elles sont générées dans des régions extra-corticales : aire rétro-bulbaire, primordium olfactif, hème cortical, éminence ganglionnaire médiane (Rakic et Zecevic 2000 ; Meyer et al. 2002 ; Hevner et al. 2003 ; Takiguchi-Hayashi et al. 2004). Très récemment, l'équipe d'A.Pierani a montré qu'une sous-population de neurones de Cajal-Retzius, qui expriment Dbx1, prolifère dans 3 régions extra-corticales : la frontière pallium-subpallium, le septum et la région aire préoptique/aire antérieure antépedonculaire (Bielle et al. 2005).

Les cellules de Cajal-Retzius sont glutamatergiques et étendent des axones tangentiels à travers la couche I pour innover des neurones pyramidaux. Elles participent à un réseau neuronal précoce qui présente une activité spontanée (Marin-Padilla 1998)

Il semblerait que, chez l'homme, il existe des neurones encore plus précoces que les deux types cellulaires précédents. Il s'agit des neurones 'prédécesseurs', qui sont issus du télencéphale basal, avant la formation des éminences ganglionnaires et l'apparition des cellules de Cajal-Retzius. Ces neurones pourraient représenter une nouvelle population neuronale très précoce, peut-être présente chez d'autres espèces (Bystron et al. 2006).

Ainsi, les neurones précoces du cortex naissent à distance de celui-ci, surtout dans le télencéphale basal, puis le rejoignent par des déplacements tangentiels.

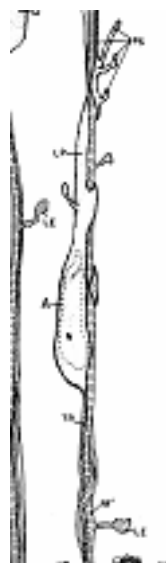
### **3 La migration neuronale**

Les neurones excitateurs et les interneurones prolifèrent dans des régions distinctes. Les neurones générés dans le télencéphale dorsal, qui donneront les neurones pyramidaux excitateurs, quittent la zone ventriculaire et migrent radialement dans le cortex, alors que les

neurones générés dans le télencéphale basal qui donneront les interneurons inhibiteurs migrent tangentiellement jusqu'au cortex embryonnaire.

### 3.1 Historique de la migration radiale

Dès la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, Camillo Golgi décrivit une organisation radiale de fibres émergeant du neuroépithélium dans la moëlle épinière embryonnaire (Golgi 1873 ; pour revue Bentivoglio et Mazzarello 1999). A la même époque, Giuseppe Magini réalisa les premières colorations de cortex embryonnaire de mammifères aux sels d'argent par la technique de Golgi. Il observa des fibres radiales provenant du neuroépithélium et des cellules intercalées le long de ces fibres. Magini fut alors le premier à associer les cellules possédant un processus radiale à la migration neuronale. Il pensa que les varicosités sur les fibres radiales de cortex embryonnaires ('comme les épines d'une rose') correspondaient à des noyaux migrant sur ces processus (Magini 1888). Santiago Ramón y Cajal fut le premier à suggérer que les fibres radiales serviraient de support pendant la corticogenèse. Cajal rejeta cependant l'existence de neurones le long des fibres radiales, comme observé par Magini. Plus tard, Berry et Rogers, ainsi que Morest qui travailla chez l'*Oppossum*, observèrent par des autoradiographies et des colorations de Nissl et de Golgi des fibres radiales multi-nucléées, et proposèrent que les noyaux des neuroblastes transloquent sur les fibres attachées à la pie, pour se séparer de la glie radiale au niveau de la surface piale (Berry et Rogers 1965 ; Morest 1970). Ce fut la microscopie électronique qui trancha la question de la migration neuronale sur la glie radiale. En effet, en 1971, P.Rakic observa chez le singe *rhesus* des cellules bipolaires en migration sur des cellules de glie radiale, identifiées par leur orientation radiale, un diamètre relativement large, des expansions lamellaires et une matrice plutôt claire (Fig.14). Ces cellules bipolaires possèdent un long processus dirigé vers la surface piale et un processus plus court en arrière (Rakic 1971). A la suite des travaux de Rakic, le concept de migration radiale est alors étroitement lié au concept de glie radiale. Par la suite, le groupe de Mary Hatten observa en 1987 pour la première fois en temps réel le comportement des neurones du cervelet de souris en migration sur des cellules de glie de Bergmann (Edmonson et Hatten 1987). En 1990, Gadisseux observa chez la souris des neurones en migration sur la glie radiale du cortex, et proposa lui aussi que la glie radiale sert de guide aux neurones en migration (Gadisseux et al. 1990).



**Fig.14 Relations neurone-glie pendant la migration d'une cellule en grain du cervelet. (Rakic 1971)**



La notion de migration radiale fut alors conceptualisée : les neurones en prolifération dans le neuroépithélium se serviraient d'un guide glial pour gagner la surface corticale et s'y établir. Dans le concept de *protomap* qui en dérive, le cortex est pré-formé avant sa constitution, et le neuroépithélium possède le « plan » d'élaboration du cortex : il existe un proto-cortex en devenir et la migration radiale est le moyen de l'élaborer. Le cortex se formerait par la mise en place de colonnes corticales générées dans la zone proliférative. La migration sur la glie radiale permettrait de translater le plan de prolifération dans les couches corticales (Rakic 1988). Ce n'est que récemment que des études ont montré que ce concept correspond à une réalité : un neuroblaste peut hériter de la fibre radiale de la cellule qui l'a engendré et s'en servir de guide pour migrer (Miyata et al. 2001).

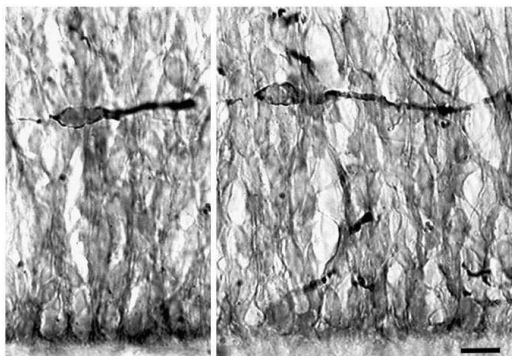
Il existe une alternative: le nouveau neurone étend un processus radial vers la pie-mère avant d'entamer sa translocation (Miyata et al. 2001).

### 3.2 Historique de la migration tangentielle

D'après le concept de *protomap*, la migration radiale permettait d'établir une relation point-à-point entre la zone ventriculaire et le cortex, entre l'endroit où un neurone post-mitotique sort du cycle de prolifération et l'endroit où il va se différencier. Mais en 1988, des études de lignage neuronal réalisées par Walsh et Cepko, chez la souris, démontrèrent que certains clones corticaux sont dispersés dans le cortex (Walsh et Cepko 1988). Ces résultats sont donc en contradiction avec l'idée que le cortex n'est formé que de colonnes corticales, de neurones qui migrent radialement à partir de leur zone de prolifération. Ces observations furent par la suite confirmées par des études avec des souris chimères et transgéniques (Tan et Breen 1993 ; Tan et al. 1995) qui permirent de montrer une large dispersion tangentielle de certains clones de cellules corticales identifiés ensuite comme des clones d'interneurones. Des études de datation au BrdU (qui s'incorpore à l'ADN et permet de suivre la progénie de cellules en division) ont aussi montré qu'il existe dans la zone intermédiaire une population distincte composée de neurones GABAergiques, et que ces neurones sont distribués tangentiellement (De Diego et al. 1994).

De nombreux travaux furent nécessaires pour asseoir le concept de migration tangentielle et déterminer l'origine de ces neurones à migration tangentielle.

En 1992, le groupe de McConnell étudia la migration neuronale dans des tranches de cortex embryonnaire de furet, injectées avec des cristaux de carbocyanine fluorescents (diI). Dans le cortex étaient présentes des cellules en migration orientées tangentiellement à la surface corticale (O'Rourke et al. 1992; Fig.15).



**Fig.15 Cellules TUJ1-positives dans la SVZ de furet (E29) avec une morphologie bipolaire de neurone en migration.**

Les cellules sont orientées parallèlement à la surface ventriculaire (bas de l'image) et sont localisées dans la ZV basale.

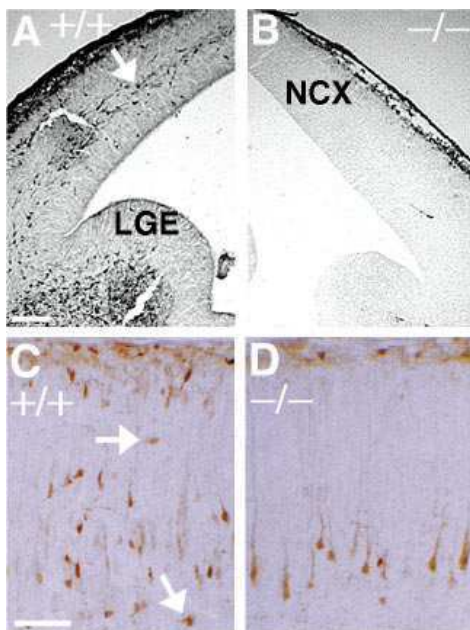
Echelle : 10µm.

(O'Rourke et al. 1995)



Des expériences de marquage *in vitro* avec des traceurs fluorescents montrèrent que la plupart des cellules en migration tangentielle de la zone intermédiaire ont pour origine le télencéphale basal (De Carlos et al. 1996 ; Tamamaki et al. 1997).

Mais les travaux qui établirent l'origine extra-corticale des interneurons corticaux furent réalisés par une approche génétique avec des souris mutantes pour *Dlx1* et *Dlx2*. La mutation de ces facteurs de transcription qui contrôlent le développement de l'EGM et de l'EGL, entraîne un déficit d'interneurones corticaux (Anderson et al. 1997). Chez l'embryon normal, les futurs interneurons *Dlx1/2* (+) produits dans les éminences ganglionnaires migrent jusqu'au cortex. Dans les tranches de cerveau embryonnaire de souris invalidées pour *Dlx1/2*, l'injection de cristaux de diI dans l'EGL ne donne aucun marquage dans le cortex (Fig.16). Cette expérience montra aussi que des neurones *Dlx1/2* (+) migrent vers le bulbe olfactif en raison de la perte des interneurons du bulbe olfactif chez le mutant *Dlx1/2*.

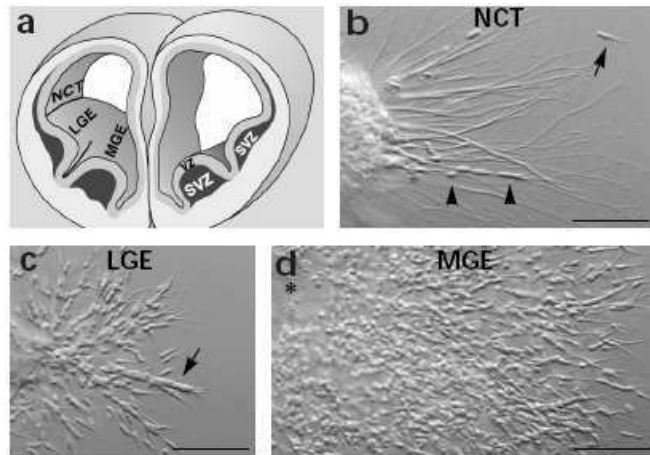


**Fig.16 Les interneurons manquent dans le néocortex des souris mutantes *Dlx1/2*(-/-).**

A-B Coupes coronales de néocortex à E14,5 de souris de sauvage (A) et *Dlx1/2*(-/-) (B) marquées pour la calbindine.

C-D à PO, des neurones pyramidaux (orange) et des interneurons marqués à la calbindine (en noir) sont présents dans le néocortex sauvage (C). Les interneurons sont moins nombreux chez le mutant (D). (Anderson et al. 1997)

En 1999, la zone précise d'origine des neurones à migration tangentielle a été précisée par les groupes de Parnavelas (Lavdas et al. 1999) et d'Alvarez-Buylla (Wichterle et al. 1999). Ces 2 groupes ont démontré, par des approches génétiques et *in vitro*, que les interneurons du cortex proviennent de l'EGM, et non de l'EGL. Les injections de traceurs fluorescents dans l'EGL marquent en réalité des neurones 'en route' vers le cortex. Le groupe de Parnavelas a montré que les interneurons corticaux en migration tangentielle expriment *Lhx6* (Grigoriou et al. 1998 ; Kimura et al. 1999 ; Lavdas et al. 1999), facteur de transcription spécifique de l'EGM. Wichterle et col. ont réalisé une étude comparative des potentiels de migration des neurones dérivés de l'EGL et de l'EGM et ont observé que l'EGM produit beaucoup plus de neurones à potentiel migratoire (Fig.17). Ces neurones de l'EGM sont capables de migrer tangentiellement dans le cortex et de s'y disperser. En revanche, les neurones de l'EGL migrent préférentiellement vers le bulbe olfactif (Wichterle et al. 1999).



**Fig.17 Cellules du cortex, de l'EGL et de l'EGM en migration dans du matrigel.**  
(Wichterle et al. 1999)

A la suite de ces travaux, l'origine sub-palliale des interneurons corticaux a été confirmée *in vivo*, en particulier grâce au mutant *Nkx2.1*, incapable de former l'EGM, chez qui il existe d'importants défauts dans la quantité d'interneurones corticaux (Nery et al. 2003).

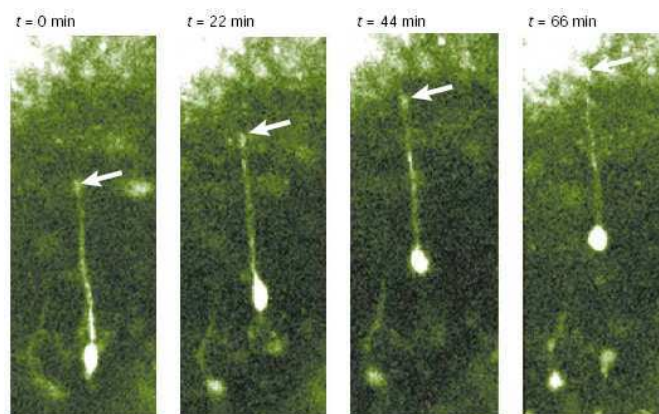
Ainsi, l'origine extra-corticale des interneurons corticaux dans l'EGM et la migration tangentielle de ces cellules sont des découvertes récentes.

### 3.3 Comportements migratoires des neurones dans le cortex en développement

#### 3.3.1 Les différents modes de migration radiale

Les neurones qui migrent radialement peuvent présenter trois types de migration : la translocation somatique, la locomotion et la migration multipolaire.

##### a- La locomotion



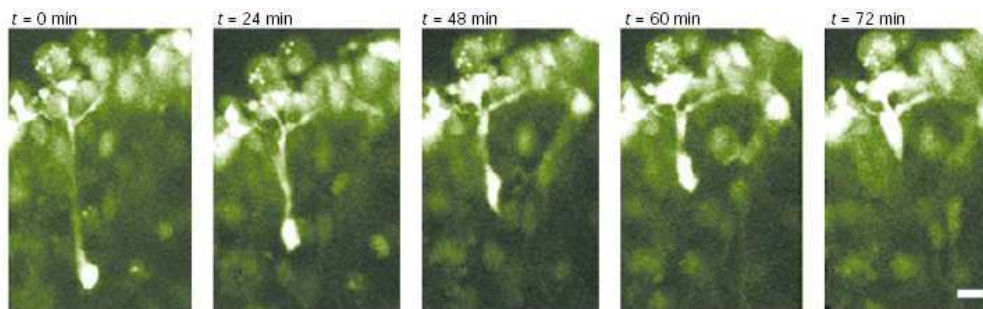
**Fig.18 Migration par locomotion d'un neurone cortical.**  
(Nadarajah et Parnavelas 2002)

Les neurones qui migrent dans le cortex par locomotion sont libres et migrent avec un processus avant relativement court (100 à 200µm) et peu branché (Rakic 1972 ; Nadarajah et al. 2001 ; Noctor et al. 2004) le long de la glie radiaire (Rakic 1978 ; Hatten 1979 ; Hatten et Mason 1990 ; voir Fig.18). Dans le cervelet, le processus avant des neurones en migration sur

la glie radiaire alterne des phases d'allongement et de rétraction, ces dernières étant moins fréquentes et donnant une avancée nette du processus avant (Edmonson et Hatten 1987). La nucléokinèse des neurones en locomotion est discontinue, et le noyau alterne des phases de mouvement rapide vers l'avant et des phases de mouvement plus discret (Nadarajah et al. 2001).

### **b- La translocation somatique**

Les neurones corticaux qui migrent par translocation possèdent un long processus dirigé vers la surface piaie, attaché à celle-ci ou dans la zone marginale (voir Fig.19 ; Morest et al. 1956 ; Schmechel et Rakic 1979 ; Voigt 1989 ; Nadarajah et al. 2001). Ces cellules, pour se positionner dans le cortex, transloquent leur noyau dans leur processus avant qui reste fixe.



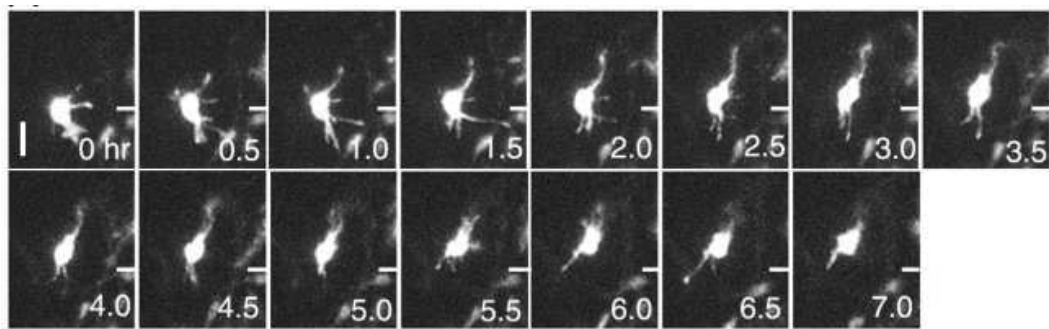
**Fig.19 Migration par translocation somatique d'un neurone cortical.**  
(Nadarajah et Parnavelas 2002)

Nadarajah et al. ont disséqué ce comportement par vidéomicroscopie en temps réel sur des neurones en migration dans des tranches d'embryons aux stades E13 et E14. Les mouvements nucléaires sont relativement continus, sans temps de pause. Ces mouvements se déroulent au fur et à mesure que le processus avant, assez branché, se raccourcit (Nadarajah et al. 2001). Notons qu'une déformation du soma de ces cellules fut observée en fin de translocation. Nadarajah et coll. proposèrent que le processus avant pourrait tirer sur le corps cellulaire pour le faire avancer lors de la migration par translocation nucléaire. Cette étude a été la première à mettre en évidence un mode de migration neuronale dans le cortex différent de la migration par locomotion le long de la glie radiaire.

La translocation pourrait représenter le mode principal de migration pendant les phases initiales du développement cortical (Nadarajah et Parnavelas 2002 ; Nadarajah et al. 2003). Aux stades précoces, les neurones de la préplaque ou des couches profondes pourraient débiter leur migration depuis la zone ventriculaire avec un processus attaché à la surface piaie. Ce processus serait aussi long que l'épaisseur du manteau cortical. Ce mécanisme pourrait organiser la protomap corticale (Rakic 1978 ; 1988).

La mutation de la protéine Reelin ou des protéines de sa voie de signalisation induisent des défauts de formation de la plaque corticale sans affecter la mise en place de la préplaque (Tissir et Goffinet 2003). L'existence d'une migration précoce par translocation suivie d'une migration plus tardive par locomotion pourrait alors expliquer pourquoi la préplaque se met en place normalement mais pas la plaque corticale, générée plus tard lorsque la locomotion des neurones intervient (Nadarajah 2003). Plus récemment, un troisième mode de migration neuronale a été identifié dans le cortex : la migration multipolaire.

### c- La migration multipolaire

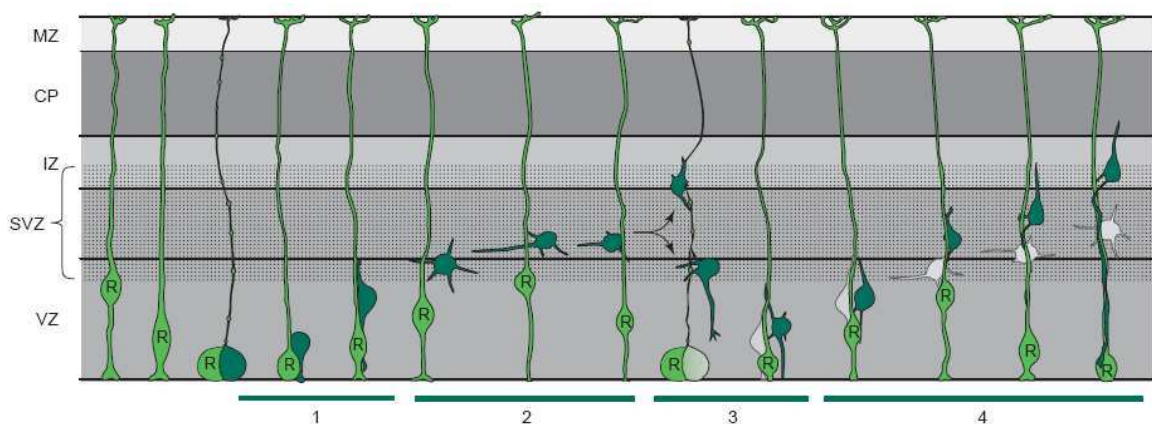


**Fig.20 Migration multipolaire d'un neurone cortical.** (Tabata et Nakajima 2003)

En 2003, l'équipe de Nakajima au Japon identifia un troisième mode de migration dans le cortex : la migration multipolaire. Les neurones en migration multipolaire inversent souvent leur polarité, et étendent et rétractent sans cesse de nombreux processus depuis leur corps cellulaire (Fig.20). Leur corps cellulaire migre lentement ( $2,2\mu\text{m.h}^{-1}$ ), contrairement au corps cellulaire des neurones en locomotion ( $9-12\mu\text{m.h}^{-1}$ ). La majorité des cellules en migration multipolaire sont observées dans la zone intermédiaire ou la zone sous-ventriculaire. A la différence des neurones en locomotion, elles ne sont pas associées (ou très peu), à la glie radiaire. Ce sont probablement de futurs neurones pyramidaux, car ils n'expriment ni le GABA ni la calbindine, mais expriment en revanche Tbr1, marqueur de la sous-plaque et des neurones précoces du cortex dorsal (Tabata et Nakajima 2003).

### 3.3.2 Les différentes phases de la migration radiale aux stades tardifs du développement cortical

Des études récentes de vidéomicroscopie en temps réel sur tranches organotypiques ont démontré que les neurones générés dans la zone germinative corticale à des stades tardifs passent par des phases de migration successives, qui se caractérisent par des changements de morphologie, de direction et de vitesse des cellules en migration (Tabata et Nakajima 2003). Ces observations ont conduit à une vue schématique dans laquelle la migration radiale s'effectue en 4 phases (Fig. 21 ; Noctor et al. 2004) :



**Fig.21 Représentation schématique des 4 phases hypothétiques de la migration radiale.** (Kriegstein et Noctor 2004)



- 1) les neurones générés dans la zone ventriculaire migrent radialement depuis la surface ventriculaire jusqu'à la zone sous-ventriculaire ;
- 2) Les neurones marquent un temps de pause dans leur migration (jusqu'à 24h), et deviennent multipolaires (Bayer et Altman 1991; Tabata et Nakajima 2003 ; Noctor et al. 2004) ;
- 3) Beaucoup de neurones migrent vers le ventricule, puis inversent leur polarité pour passer à la phase 4 ;
- 4) Les neurones étendent un processus vers la surface piaie, récupèrent une morphologie bipolaire et migrent radialement vers la plaque corticale (cette étape peut se dérouler sans la phase 3). A ce moment-là, la migration serait plutôt de type gliophilique, et les neurones migreraient par locomotion.

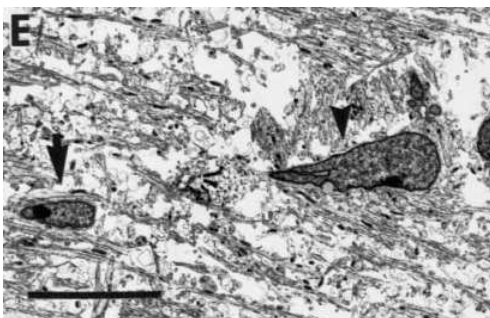
### 3.3.3 Le mode de migration tangentiel

C'est le mode de migration des interneurons corticaux nés dans le sub-pallium. Il n'est pas restreint à cette population neuronale. Parmi les autres types de cellules qui migrent tangentiellement, on trouve les neurones qui migrent dans le flux de migration rostral (Rostral Migratory Stream RMS) chez l'embryon et chez l'adulte, les oligodendrocytes, les neurones striataux GABAergiques et cholinergiques, les neurones pré-cérébelleux et chez l'homme les interneurons du sub-pallium qui migrent vers le thalamus dorsal (Letinic et Rakic 2001).

Les neurones qui migrent tangentiellement présentent une morphologie et une dynamique de migration très caractéristique.

#### a- Des neurones avec une morphologie bipolaire branchée

Les caractéristiques morphologiques des neurones en migration tangentielle furent établies pour la première fois par O'Rourke et McConnell (1992 ; Fig.22). Ils présentent une morphologie bipolaire de neurones en migration et sont préférentiellement orientés parallèlement à la surface corticale.



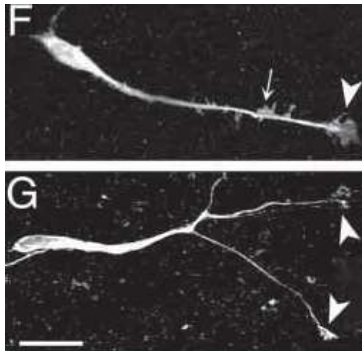
**Fig.22 Images de microscopie électronique de cellules en migration dans la zone intermédiaire de furet (P1).**

Deux cellules non-radiales migrent à travers des axones orientés tangentiellement. Le corps cellulaire et le processus avant contactent les axones. Echelle : 10µm.

(O'Rourke et al. 1995)

Les interneurons présentent en outre la particularité d'avoir une morphologie branchée (Edmunds et Parnavelas 1982 ; Derer et Derer 1990 ; Lavdas et Parnavelas 1999). Leur processus avant est long, assez fin, et bifurqué : l'arbre neuritique avant est très complexe. Ces cellules possèdent de gros cônes de croissance avec des filopodes et des lamellipodes, ainsi que parfois un fin processus de queue (trailing process) (Wichterle et al. 1999 ; Wichterle et al. 2001 ; Polleux et al. 2002 ; Bellion et al. 2005). Polleux fut le premier à étudier en temps réel le comportement migratoire de cellules de l'EGM. Pour cela il apposa des explants de cortex sauvage et des explants de télencéphale basal prélevés sur des embryons qui expriment la GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle d'un promoteur

ubiquitaire (Polleux et al. 2002). Il observa en temps réel les remaniements en temps réel de l'arbre neuritique avant (Fig.23). Ces remaniements morphologiques complexes ont été observés par la suite par de nombreuses équipes, dont l'équipe de C.Métin (Nadarajah et al. 2003 ; Bellion et al. 2005). Polleux suggéra en outre que les transformations de l'arbre neuritique corrèlent avec le comportement du corps cellulaire des interneurones en migration.



**Fig.23 Aspects morphologiques d'interneurones en migration (marquage GFP).**

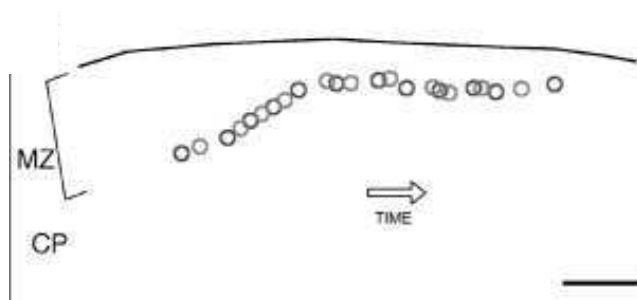
Ces cellules possèdent un processus avant mesurant 10-15 fois la longueur du corps cellulaire. Ce processus se termine généralement par un cône de croissance large (têtes de flèches) et porte souvent de multiples filopodes (flèche fine).

(Polleux 2002)

## b- Nucléokinèse saltatoire dans les interneurones corticaux en migration

En dépit des transformations complexes de leur arbre neuritique à l'avant, les interneurones en migration présentent un cycle de migration à 2 phases, responsable de mouvements saltatoires du corps cellulaire (Polleux et al. 2002 ; Bellion et al. 2005). Le noyau alterne des phases de pause et des phases de translocation rapide vers l'avant, qui sont corrélées avec l'élongation des neurites et éventuellement la division des cônes de croissance (Fig.24 ; Moya et Valdeolmillos 2004 ; Bellion et al. 2005). Ces deux phases sont clairement dissociées dans le temps et plus faciles à observer que dans les neurones en migration radiale (Edmonson et Hatten 1987 ; Rivas et Hatten 1995 ; Solecki et al. 2004).

Une autre caractéristique des interneurones en migration est qu'ils migrent plus rapidement ( $50\mu\text{m.h}^{-1}$  en moyenne) que les neurones excitateurs ( $10\mu\text{m.h}^{-1}$  en moyenne) (O'Rourke 1992, 1997 ; Chenn et al. 1995 ; Takahashi 1996 ; Wichterle et al. 1999 ; Polleux et al. 2002 ; Ang et al. 2003 ; Tabata et al. 2003 ; Noctor et al. 2004 ; Bellion et al. 2005).



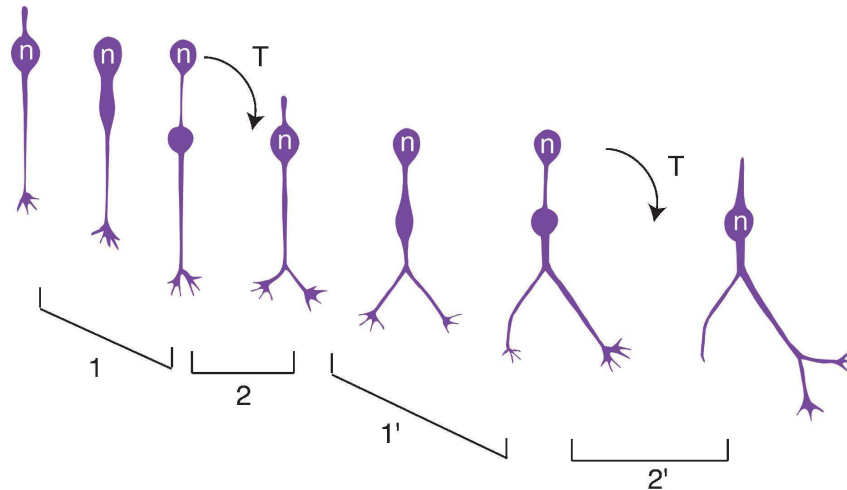
**Fig.24 Illustration de la cinétique de migration d'une cellule de l'EGM à E15 exprimant la GFP dans la ZM.**

Chaque cercle représente la position du corps cellulaire toutes les 15 min et montre que le corps cellulaire transloque selon un mode de migration saltatoire.

(Polleux 2002)

Nos études ont montré que les interneurones corticaux en migration présentent un cycle de migration qui comprend deux phases (voir Fig.25 ; Bellion et al. 2005):

- 1) une phase de pause du noyau, pendant laquelle un renflement se forme depuis le soma, qui va se positionner à distance du noyau dans le neurite de tête. Pendant cette phase le neurite principal s'allonge et des branches latérales se rétracter ;
- 2) Le noyau transloque rapidement dans le renflement. Pendant cette phase on observe souvent des divisions des cônes de croissance.



**Fig.25 Cycle de migration des cellules issues de l'EGM.**

- 1) Formation d'un renflement à l'avant du noyau ;
- 2) Translocation rapide du noyau dans le renflement ;
- 1') Division du cône de croissance principal et élongation neuritique/ formation d'un renflement ;
- 2') Translocation du noyau, rétraction et allongement des neurites à l'avant.

### 3.4 Les mouvements antérogrades du centrosome et le découplage noyau-centrosome dans les neurones en migration

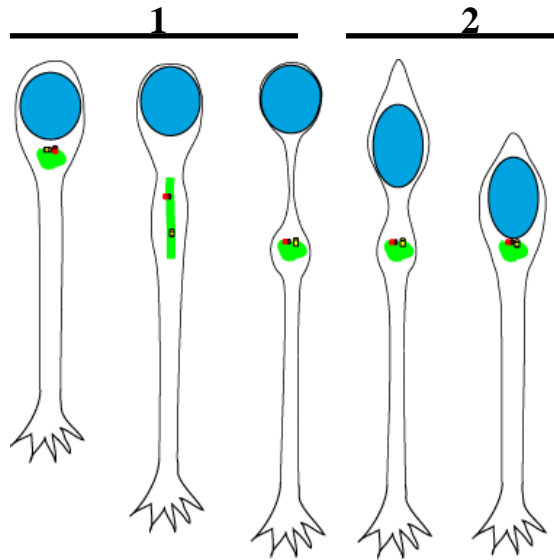
Les travaux de Solecki (du groupe de Mary Hatten) ont montré que la nucléokinèse des cellules en grains du cervelet est précédée par un mouvement vers l'avant du centrosome qui précède celui du noyau (Solecki et al. 2004). La nucléokinèse saltatoire des neurones du cervelet en migration s'accompagne ainsi d'une dissociation spatiale entre le centrosome et le noyau lorsque ce dernier marque un temps de pause. En outre, dans un neurone stationnaire le centrosome stoppe ses mouvements antérogrades et se déplace de façon aléatoire dans le soma (Solecki et al. 2004). Ainsi, Solecki et coll. ont décrit une nucléokinèse en deux-temps dans les neurones du cervelet en migration avec:

- 1) pause du noyau et mouvement du centrosome vers l'avant de la cellule,
- 2) translocation nucléaire vers le centrosome.

Cette observation fut maintes fois confirmée dans les cellules des grains du cervelet (Shu et al. 2004 ; Tanaka et al. 2004 ; Toyo-Oka et al. 2005 ; Umeshima et al. 2007), ainsi que dans les neurones corticaux (Kamiya et al. 2005 ; Tsai et al. 2007).

Nous avons observé le même phénomène dans les interneurones corticaux en migration (Fig.26):

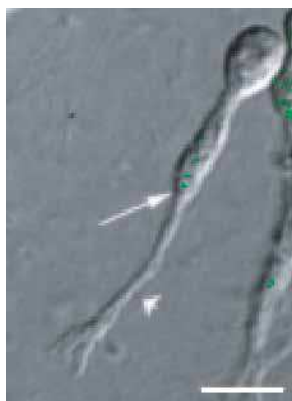
- 1) lorsque le noyau marque un temps de pause, le centrosome et l'appareil de Golgi qui lui est associé migrent à grande distance (jusqu'à 30µm) dans le neurite de tête jusqu'à un renflement. Durant cette migration du centrosome, les deux centrioles sont capables de se séparer.
- 2) dans un deuxième temps le noyau rejoint le centrosome et l'appareil de Golgi par une translocation rapide (Bellion et al. 2005).



**Fig.26 Mouvements du noyau et du complexe centrosome/appareil de Golgi au cours du cycle de migration des interneurones corticaux**

La nucléokinèse en deux temps et le découplage entre le noyau et le centrosome qui lui est associé sont aussi observés dans les neurones à migration tangentielle de la zone sous-ventriculaire (Fig.27; Schaar et McConnell 2005 ; Koizumi et al. 2006).

Chez l'adulte, ces neurones participent au renouvellement de l'épithélium olfactif. Ils sont générés dans la zone sous-ventriculaire (ZSV), au niveau de la région antérieure des ventricules latéraux, par des astrocytes qui expriment la GFAP (Doetsch et al. 1999 ; Garcia et al. 2004). Ces astrocytes entourent aussi les neurones en migration le long de leur parcours au niveau des ventricules latéraux et dans le RMS (Rostral Migratory Stream) jusqu'au bulbe olfactif (Doetsch et al. 1996). Les neurones du RMS s'incorporent dans la couche granulaire profonde ou la couche superficielle périglomérulaire du bulbe olfactif pour s'y différencier en interneurones GABAergiques ou dopaminergiques. Ces neurones de la zone sous-ventriculaire présentent la particularité de se déplacer 'en chaîne', migrant les uns sur les autres (Lois et al. 1996 ; Wichterle et al. 1997).



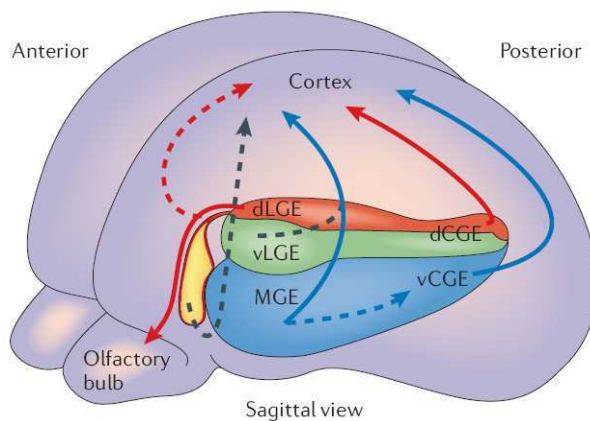
**Fig.27 Neurone de la ZSV en migration avec une morphologie bipolaire typique.**

La flèche illustre la localisation des centrosomes marqués avec de la Centrine2-GFP.

(Koizumi et al. 2006)



### 3.5 Les voies de migration tangentielle dans le télencéphale embryonnaire



**Fig.28 Voies de migration des sous-populations d'interneurons corticaux depuis le télencéphale basal.**

Voies de migration établies (flèches pleines) et hypothétiques (flèches interrompues) :

BLEU : EGM et EGC ventrale qui donnent des interneurons à Somatostatine (STT) ou à Parvalbumine (PV).

ROUGE : EGL dorsale qui donne des interneurons à Calrétinine (CR).

JAUNE : région septale Vax1-positve qui donne des interneurons dont le sous-type reste à établir.

(Wonders et al 2006)

Les voies de migration tangentielle des interneurons corticaux varient durant le développement du néocortex (Casarosa et al. 1999 ; Ang et al. 2003).

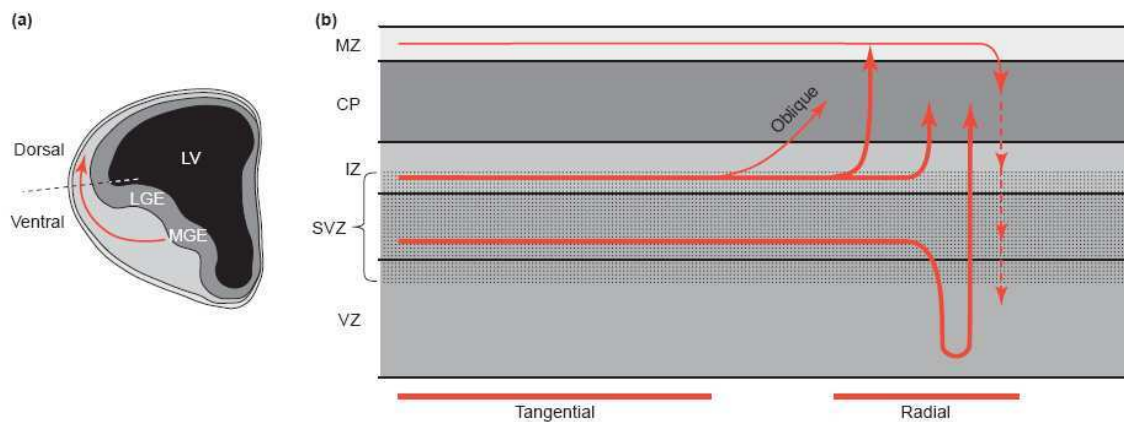
Chez les rongeurs, pendant la neurogenèse précoce, les interneurons dérivés de l'EGM migrent dans la zone intermédiaire. Plus tardivement, ils migrent dans la zone ventriculaire et la zone sous-ventriculaire striatales avant d'entrer dans le cortex. Les cellules dérivées de l'EGL migrent tangentiellement à travers la zone sous-ventriculaire pour gagner la plaque corticale (De Carlos, 1996 ; Anderson et al. 2001 ; Jimenez et al. 2002). Les études de la migration d'interneurons qui expriment spécifiquement la GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle du promoteur d'une enzyme de synthèse du GABA (GAD67-GFP), ont permis une étude plus approfondie des voies de migration des interneurons. Elles ont confirmé que la migration des interneurons corticaux se déroule en deux vagues précoces (Marin et Rubenstein 2001):

- 1) interneurons issus de l'EGM et de l'Aire Anté-Pédonculaire (AEP) qui migrent dans la zone marginale corticale vers E11,
  - 2) interneurons issus de l'EGM surtout, et de l'EGL à un moindre degré, qui migrent dans la zone intermédiaire profonde et la zone sous-ventriculaire, ainsi que vers le striatum et le bulbe olfactif, vers E12-14,
- puis une vague plus tardive
- 3) de l'EGM et l'EGL vers le cortex à E14-E16.

Dans le cortex, les interneurons en migration sont particulièrement nombreux dans la zone intermédiaire profonde, la zone sous-ventriculaire et la sous-plaque (Lavdas et al. 1999 ; Anderson et al. 2001 ; Wichterle et al. 2001 ; Jimenez et al. 2002 ; Ang et al. 2003 ; Tanaka et al. 2003). Une fois dans le cortex, les interneurons se dispersent tangentiellement, et gagnent la plaque corticale par ses couches profondes en migrant radialement ou de façon oblique (Figure 29 ; Anderson et al. 2001 ; Polleux et al. 2001 ; Ang et al. 2003 ; Tanaka et al. 2003 ; Nadarajah et al. 2002). Au contraire, les interneurons en migration dans la ZM y pénètrent par la surface (Ang et al. 2003 ; Tanaka et al. 2003).

Dans des tranches organotypiques de cortex, Nadarajah et al. ont observé que des cellules qui migrent d'abord tangentiellement dans la zone intermédiaire du cortex se réorientent ensuite vers le ventricule (*ventricule-directed migration*). Une fois le ventricule atteint, les cellules inversent leur direction de migration et gagnent la plaque corticale (Nadarajah et al. 2002). La majorité de ces cellules sont des interneurons originaires du télencéphale basal. La fréquence de cette migration dirigée vers le ventricule augmente avec le temps. La ZV pourrait ainsi

fournir des informations aux neurones pour qu'ils se positionnent correctement dans le cortex, des facteurs épigénétiques contrôlant la lamination corticale des interneurones (Nadarajah et al. 2002 ; Nadarajah et Parnavelas 2002). Une autre possibilité serait que cette migration dirigée vers le ventricule soit spécifique d'un sous-type particulier d'interneurones.



**Fig.29 Les voies de migration des interneurones corticaux originaires du télencéphale ventral.**

A- La plupart des interneurones sont générés dans l'EGM et migrent à travers la jonction cortico-striatale (ligne brisée) pour entrer dans le télencéphale dorsal.

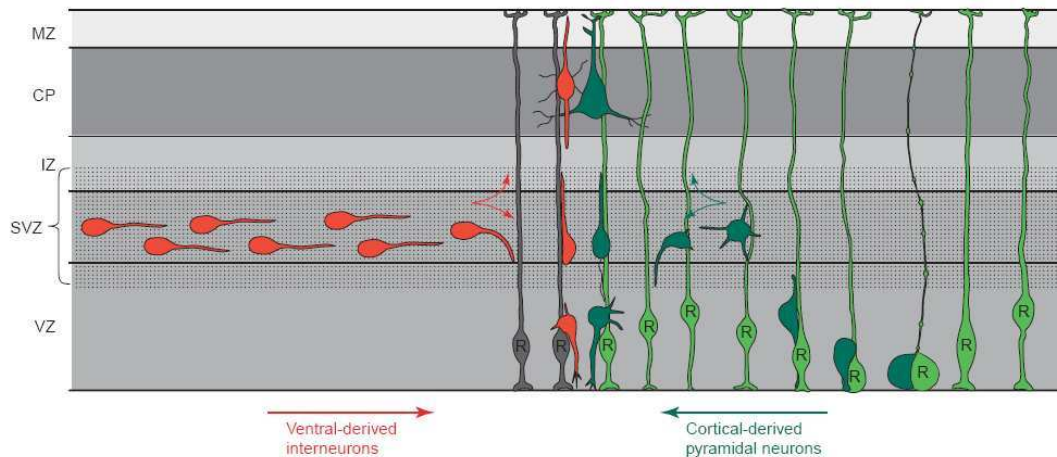
B- Les phases de la migration des interneurones dans le télencéphale dorsal.

Abbreviations : CP Plaque Corticale ; IZ Zone Intermédiaire ; LGE Eminence Ganglionnaire Latérale ; LV Ventricule Latéral ; SVZ Zone Sous-Ventriculaire ; VZ Zone Ventriculaire. Adapté de *Kriegstein et Noctor 2004*.

Les interneurones, comme les neurones pyramidaux, s'établissent dans le cortex selon une séquence « inside-out » : les interneurones qui sont sortis du cycle de prolifération en premier se retrouvent dans les couches profondes du cortex, ceux sortis le plus tard se retrouvent dans les couches superficielles du cortex (à l'exception peut-être des interneurones à somatostatine, voir Cavanagh et Parnavelas 1988 ; Kriegstein et Noctor 2004).

Mais alors comment s'effectue la synchronisation temporelle des neurones post-mitotiques dans le cortex ? Comment deux neurones post-mitotiques nés localement ou à grande distance du cortex peuvent-ils se positionner dans la même couche corticale ?

Leurs trajets de migration respectifs permettraient aux neurones excitateurs et aux interneurones de se synchroniser (Kriegstein et Noctor 2004). En effet, les neurones pyramidaux pourraient séjourner quelques temps au niveau de la SVZ, 'attendant' ainsi les interneurones nés au même moment mais pas encore arrivés dans le cortex dorsal. Les deux populations du même âge se rencontrant, elles pourraient alors gagner la plaque corticale ensemble, ou du moins au même moment (Voir Fig.30).



**Fig.30 Convergence des interneurones et des neurones pyramidaux dans le cortex dorsal.** Ce schéma illustre l'apparente convergence des voies de migration des interneurones (rouge) et des mouvements des neurones pyramidaux (vert) dans le cortex.

Abbréviations : IZ Zone Intermédiaire ; MZ Zone Marginale ; R cellule de glie radiaire ; SVZ Zone Sous-Ventriculaire ; VZ Zone Ventriculaire.

(Kriegstein et Noctor 2004)

### 3.6 Molécules de guidage des interneurones corticaux en migration

Les interneurones corticaux subissent l'action de molécules de guidage qui peuvent être de deux types :

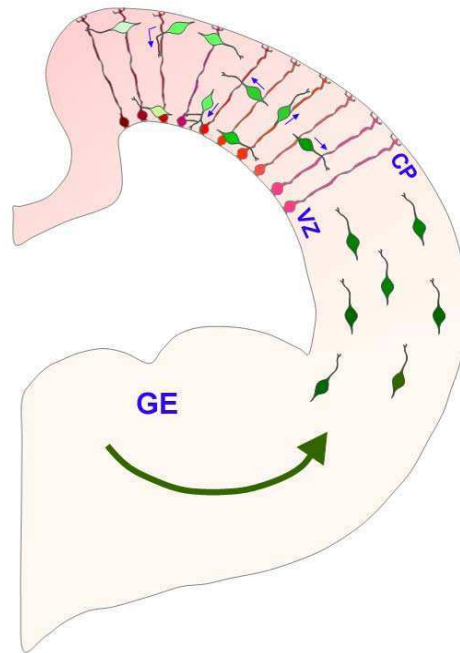
- 1) des molécules adhésives portées par les cellules du substrat, soit permissives soit répulsives pour la migration des interneurones ;
- 2) des molécules sécrétées par des cellules à proximité ou à distance des interneurones, qui stimulent ou inhibent leur motilité.

#### 3.6.1 Facteurs de contact permissifs

Plusieurs types de protéines d'adhésion contrôlent la migration des interneurones corticaux. Premièrement, la molécule **TAG-1** (membre de la superfamille des immunoglobulines) est exprimée par les efférences corticales. Les marquages immunohistochimiques de cette molécule mettent en évidence son expression sur des axones sur lesquels migrent des interneurones. Des anticorps bloquant anti-TAG1 ou des formes solubles de TAG-1 inhibent la migration des interneurones issus de l'EGM, qui s'accumulent au niveau de la frontière striato-corticale (Denaxa et al. 2001). En revanche, la migration des interneurones chez le mutant TAG-1 est normale (Denaxa et al. 2005), ce qui interroge sur la validité des résultats obtenus *in vitro*.

Deuxièmement, la molécule **PSA-NCAM** (PolySialylated Neural Cell Adhesion Molecule) intervient dans la migration en chaîne des interneurones générés dans la zone sous-ventriculaire. PSA-NCAM est exprimée par les neuroblastes de la zone sous-ventriculaire et permet ainsi à ces cellules de migrer par des contacts étroits les unes sur les autres (Hu et al. 1996). Enfin, après que la glie radiaire et les axones aient été suggérés dans un rôle de guide pour la migration tangentielle (O'Rourke 1995 ; Métin et Godement 1996 ; Denaxa et al. 2001 ; Letinic et al. 2002 ; Nadarajah et al. 2002 ; Ang et al. 2003 ; Rakic et Zecevic 2003 ; McManus et al. 2004), il semblerait finalement que la **glie radiaire** puisse en effet participer au guidage des interneurones. Les interneurones peuvent changer de direction après avoir contacté une fibre de glie radiaire et peuvent s'en servir de guide pour gagner la plaque corticale ou se diriger vers le ventricule (Fig.31 ; Yokota et al. 2007). De plus, le réseau de

glie radiaire semble nécessaire à la migration tangentielle des interneurones (Poluch et Juliano 2007). Enfin, il a récemment été montré que la migration radiale le long de la glie radiaire est contrôlée par les jonctions de type ‘gap’, selon un processus purement adhésif (Elias et al. 2007). Selon les auteurs, ces jonctions permettraient d’établir des points d’ancrage pour le neurone en migration, et plus particulièrement de stabiliser la zone du centrosome dans le neurite de tête pour que le noyau y transloque. Ce type de mécanisme pourrait jouer un rôle dans la migration des interneurones corticaux.



**Fig.31 Interactions interneurones/glie radiaire dans le cortex en développement.**  
(Yokota et al. 2007)

### 3.6.2 Facteurs attractifs

Le **HGF/SF** (Hepatocyte Growth Factor/Scattered Factor), ligand du récepteur c-Met, est exprimé dans le télencéphale sous deux formes : i) une forme non-clivée inactive et ii) une forme clivée active. Cette expression débute à E11, atteint un pic à E13, puis diminue à partir de E18 pour persister post-natalement. L’expression du récepteur c-Met subit le même profil d’expression. Ce facteur est motogénique, c’est-à-dire qu’il stimule la migration des interneurones corticaux. Chez le mutant u-Par, incapable de cliver l’HGF/SF, les interneurones sont moins nombreux dans le cortex et s’accumulent à la frontière cortico-striatale. Dans le cortex, l’HGF/SF est retrouvé au niveau des zones marginale et intermédiaire (Powell et al. 2001).

Les neurotrophines **BDNF** (Brain Derived Nerve Factor) et **NT4** (Neurotrophine4) sont motogéniques et stimulent la migration des interneurones, par l’intermédiaire des récepteurs TrkB (Polleux et al. 2002). La NT4 est fortement exprimée par la plaque corticale et la zone marginale, faiblement dans la ZI et la zone du manteau des éminences ganglionnaires. La NT4 est en outre exprimée par la glie radiaire. L’inactivation pharmacologique ou génétique des récepteurs Trk entraîne une forte réduction de la densité des interneurones corticaux. Les endocannabinoïdes stimuleraient également la migration des interneurones corticaux, en activant le récepteur TrkB (Berghuis et al. 2005). La voie de signalisation en aval de ces récepteurs passe par la PI3Kinase (Polleux et al. 2002).

Le **GDNF** (Glial-Derived Neurotrophic Factor ; Lin et al. 1993), par l'intermédiaire de son récepteur GFR $\alpha$ 1, récepteur ancré avec un groupement GPI et qui fonctionne en synergie avec le récepteur à Tyrosine-kinase RET et les protéines transmembranaires de la famille NCAM, stimule la différenciation des précurseurs ventraux en interneurons et stimule leur motilité. Ceci a été démontré par l'étude des animaux mutants pour le GDNF ou son récepteur GFR $\alpha$ 1 (Pozas et Ibáñez 2005). Récemment, un effet du GDNF sur les interneurons du courant de migration rostral a aussi été mis en évidence (Paratcha et al. 2006).

Les neurégulines (NRG1-4) jouent un rôle important dans la différenciation des neurones et des cellules gliales (Falls et al. 2003). La **NRG1** stimule la migration des interneurons de l'EGM, en particulier au niveau de la frontière striato-pallidale (Flames et al. 2004). Ces molécules sont des ligands des récepteurs ErbB (ErbB1 à ErbB4), récepteurs à l'EGF (Epithelial Growth Factor) de type Tyrosine-kinases (Buonanno et Fischbach 2001). Le récepteur ErbB4 est exprimé dès E13 d'abord dans l'EGM puis de façon diffuse dans tout le cortex à l'âge adulte (Yau et al. 2003). Il co-localise avec le facteur de transcription Dlx2, spécifique des interneurons, et se trouve surtout dans les interneurons à Parvalbumine (Yau et al. 2003). La forme soluble des neurégulines, le GGF (Glial Growth Factor), contrôle une signalisation bi-directionnelle entre les fibres de glie radiaire et les neurones en migration, et est importante pour maintenir l'intégrité de la glie radiaire et la migration neuronale (Anton et al. 1997). En outre il est intéressant de noter que des mutations de la NRG1 sont corrélées à des formes de schizophrénie.

Le **SDF1** (Stromal Derived Factor 1), ligand du récepteur CXCR4 (CxC Chemokine Receptor 4), est exprimé par les méninges et par des progéniteurs basaux des zones sous-ventriculaire et intermédiaire (Tham et al. 2001 ; Stumm et al. 2003 ; Tiveron et al. 2006). Cette voie de signalisation participerait ainsi à la synchronisation de la migration des interneurons et des neurones excitateurs.

Les récepteurs Robo1 et Robo2 sont exprimés pendant toute la durée de la corticogenèse, et colocalisent avec des marqueurs d'interneurons. Leurs ligands **Slits1/2** contrôlent la migration des interneurons dans le télencéphale basal, et plus particulièrement leur positionnement près de la ligne médiane (Hu et al. 1999 ; Wu et al. 1999 ; Zhu et al. 1999). En revanche, ces facteurs ne sont pas nécessaires à la migration tangentielle dans le cortex, bien qu'ils semblent contrôler la morphologie des interneurons en migration (Marin et al. 2003). Chez les mutants pour Robo1 ou chez les double mutants Slit1(-)/Slit2(-), on observe une augmentation du nombre d'interneurons dans le cortex, qui serait due à un excès de prolifération (Andrews et al. 2006, 2007, 2008).

Enfin, les vaisseaux sanguins pourraient contrôler la migration neuronale, et permettre aux interneurons de se disperser (Raisman et al. 1988 ; Anderson et al. 1993 ; Kawamura et al. 1993 ; Wichterle et al. 1999). Certains travaux illustrent le rôle du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) sur la migration neuronale (Schwarz et al. 2004 ; Maggi et al. 2005). Balenci et al. proposent que le VEGF synthétisé par les astrocytes pourrait être impliqué dans le guidage des précurseurs jusqu'à des niches neurogéniques (Balenci et al. 2007). De plus, des études très récentes chez des animaux adultes mettent en évidence le rôle de la vascularisation sur la neurogenèse et la migration des neuroblastes après lésion (Masuda et al. 2007 ; Thored et al. 2007). Ainsi, la migration des interneurons pourrait aussi être influencée par les vaisseaux sanguins et le VEGF.

### 3.6.3 Facteurs répulsifs

Les **sémaphorines 3A** et **3F** sont les ligands respectifs des récepteurs Neuropiline1 et 2 (Nrp1,2). Les sémaphorines 3A et 3F sont sécrétées au niveau du télencéphale basal dans la région du futur striatum et inhibent la migration des interneurones. La région qui sécrète ces molécules se trouvant à proximité de celle de prolifération des interneurones, ces derniers n'expriment les Nrp qu'après avoir franchi la jonction cortico-striatale (Marin et al. 2001).

### 3.6.4 Un cas particulier, les neurotransmetteurs

Le véritable effet des neurotransmetteurs n'est pas encore bien compris. De nombreuses expériences illustrent un rôle de ces molécules dans la motilité des interneurones, mais un rôle clair de guidage de ces cellules avec des effets attractifs ou répulsifs n'a pas encore été établi.

Le **GABA** et le **glutamate** contrôleraient la migration des interneurones corticaux selon un mode paracrine. L'effet de ces neurotransmetteurs n'est pas encore bien compris. Les interneurones en migration expriment des récepteurs au GABA de types GABA<sub>A</sub> (Metin et al. 2000 ; Soria et Valdeolmillos 2002) et GABA<sub>B</sub> (Lopez-Bendito et al. 2003), et des récepteurs au Glutamate de type AMPA (Metin et al. 2000 ; Poluch et al. 2001 ; Soria et Valdeolmillos 2002). Le GABA stimulerait la migration des interneurones hors des couches profondes du cortex : un blocage des récepteurs GABA<sub>B</sub> entraîne une accumulation des interneurones dans les zones ventriculaire et sous-ventriculaire corticales (Lopez-Bendito et al. 2003). Dans l'hippocampe, le glutamate stimule la migration des interneurones par l'intermédiaire des récepteurs de type AMPA (Manent et al. 2006). La **dopamine** stimule la migration des interneurones corticaux. L'exposition de femelles gestantes à de la cocaïne perturbe la migration des interneurones dans le cortex de leurs embryons (Crandall et al. 2004). *In vitro*, l'activation des récepteurs D1 à la dopamine stimule la migration des interneurones depuis le télencéphale vers le cortex, et en revanche l'activation des récepteurs D2 bloque leur migration. Ces résultats furent confirmés avec des animaux mutants pour les récepteurs de la dopamine (Crandall et al. 2007) et illustrent ainsi un effet différentiel de la dopamine, qui suggère que des populations d'interneurones répondent peut-être différemment à la dopamine.



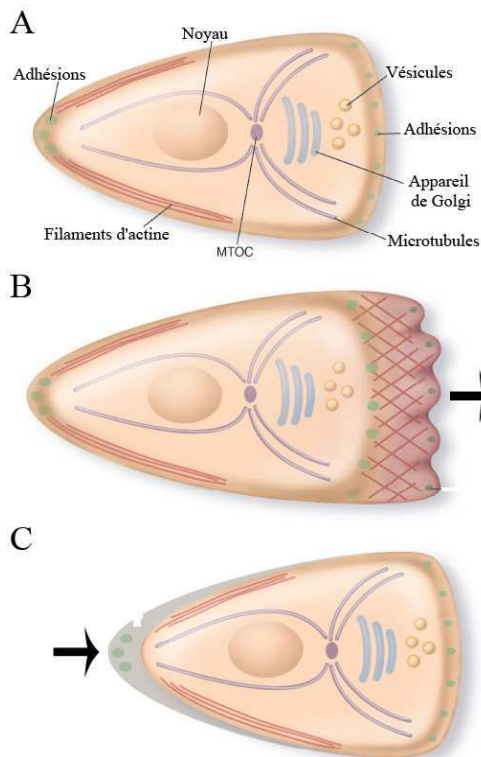
## II MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE LA MIGRATION NEURONALE

### 1 Généralités sur la migration cellulaire et originalité de la migration neuronale

La migration cellulaire est décrite comme un processus dynamique et cyclique dans lequel :

- 1) des protusions se forment à l'avant et s'ancrent au substrat au niveau de zones d'adhésion
- 2) le corps cellulaire se contracte pour rejoindre l'avant de la cellule et
- 3) l'adhésion au substrat à l'arrière est défaite, ce qui ramène l'arrière vers le corps cellulaire (voir Fig.32).

Ces étapes requièrent l'intégration complexe de transformations locales déclenchées par des signaux extérieurs et un remodelage de l'architecture cellulaire. Ces signaux extérieurs (par exemple des facteurs chimiotactiques) induisent une polarisation initiale de la cellule (Horwitz et Webb 2003 ; Ridley et al. 2003 ; Vicente-Manzanares et al. 2005). Dans la plupart des cellules migratrices, cette polarisation implique l'activation du cytosquelette d'actine et la réorganisation du cytosquelette de microtubules. Une fois la direction de mouvement établie, la machinerie nécessaire pour mouvoir la cellule se met en marche. Les complexes d'adhésion nécessaires à la traction de la cellule se stabilisent au niveau des protrusions (Ridley et al. 2003). Ils servent de point d'ancrage aux filaments d'acto-myosine qui tirent le corps cellulaire vers les protrusions. Le relâchement des adhésions à l'arrière et la contraction du corps cellulaire achèvent le processus. La migration cellulaire nécessite le remodelage coordonné des différents éléments du cytosquelette en réponse à l'activation de voies de signalisations dont plusieurs ont été identifiées (Ridley et al. 2003).



**Fig.32 Les étapes de la migration cellulaire.**

- A. Polarisation initiale d'une cellule en migration (une organisation asymétrique de la cellule se met en place, avec un pôle avant et un pôle arrière).
  - B. Formation de protrusions et d'adhésions au front avant.
  - C. Rétraction de l'arrière, par dé-adhésion et contraction du corps cellulaire.
- (Ridley et al. 2003)

Les neurones en migration présentent le plus souvent une morphologie bipolaire, caractéristique des cellules en migration (Rakic 1971 ; Gadisseux et al. 1990 ; O'Rourke et McConnell 1995 ; Nadarajah et al. 2001 ; Tabata et Nakajima 2003). Le comportement

dynamique des neurones en migration radiale ou tangentielle a largement été étudié (Edmonson et Hatten 1987; O'Rourke et McConnell 1995 ; Nadarajah et al. 2001 ; Polleux et al. 2002 ; Tabata et Nakajima 2003 ; Solecki et al. 2004). Il ressort de ces études sur la dynamique de la migration neuronale, que comme les autres cellules motiles, les neurones progressent dans leur environnement en répétant un cycle comprenant deux ou trois phases :

- 1) extension de protrusions à l'avant de la cellule ;
- 2) translocation du corps cellulaire et
- 3) rétraction de l'arrière.

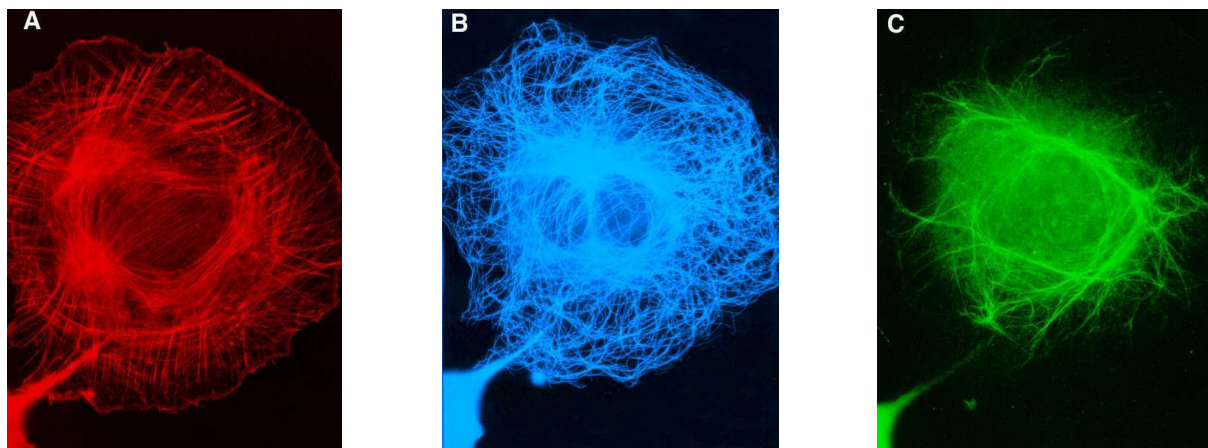
Ceci est valable pour la migration radiale par locomotion ou tangentielle. Dans la migration radiale par translocation somatique, les phases 2 et 3 sont concomitantes.

Les neurones en migration se déplacent ainsi de la même façon que les autres types cellulaires, mais les neurones présentent une morphologie très polarisée caractéristique et spécialisée avec à l'avant un ou plusieurs neurites terminés par des cônes de croissance qui explorent l'environnement. Si l'étude de la migration neuronale s'appuie sur les données obtenues dans les autres types cellulaires, elle permet en contrepartie d'obtenir de nouvelles données fondamentales grâce à des propriétés migratoires uniques dans un système cellulaire hautement organisé.

L'architecture d'une cellule et le remodelage de celle-ci nécessaire à sa migration est assuré par son cytosquelette, dans les types cellulaires classiques comme dans les neurones.

## 2 Le cytosquelette

Le cytosquelette est composé de 3 systèmes, qui coopèrent pour contrôler la stabilité ou le remodelage de la forme d'une cellule (Fig.33).



**Fig.33 Les trois systèmes du cytosquelette d'un fibroblaste, observés en microscopie à fluorescence, après fixation et marquage avec des marqueurs spécifiques.**

- A- le cytosquelette d'actine, marqué avec de la phalloïdine;
- B- le cytosquelette de microtubules, marqué avec un anticorps anti-tubuline et
- C- le cytosquelette de filaments intermédiaires, marqué avec un anticorps anti-vimentine.

(Small et al. 1994)

### 2.1 Le cytosquelette d'actine

Des 3 composants du cytosquelette, les filaments d'actine sont ceux qui modèlent la membrane cellulaire et qui contribuent directement à sa forme (Pollard et Borisy 2003). Dans les cellules en migration, ils contrôlent la formation des protrusions, la production de forces



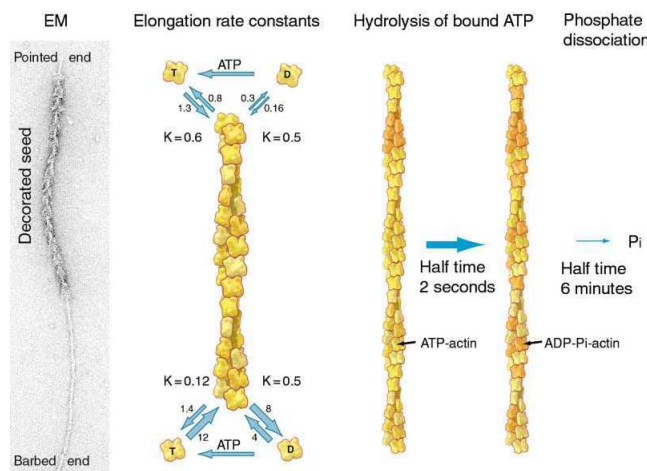
de tension en association avec les filaments de myosine, et sont impliqués dans l'établissement et le contrôle des sites d'adhésion.

### 2.1.1 Structure et rôle des filaments d'actine

Trois types de structures riches en actine sont identifiés dans une cellule :

- le lamellipode, qui est comme son nom l'indique une structure lamellaire étalée dans laquelle les filaments d'actine forment un réseau 'dendritique' branché (Fig.36);
- le filopode, structure étirée et très fine organisée par l'agencement parallèle de fibres d'actines à la périphérie de la cellule (Fig.38). Les filopodes permettent probablement à la cellule en migration de 'sentir' son environnement, mais ils ne semblent pas nécessaires au processus migratoire *per se* ;
- les fibres de stress (Fig.39), faisceaux contractiles d'actine filamenteuse associée à de la myosine II, qui s'ancrent au niveau d'adhésions focales et exercent des forces de traction sur la cellule.

Le cytosquelette d'actine est formé de microfilaments d'actine, polymères de molécules d'actine. Les microfilaments d'actine sont polarisés et présentent une extrémité « barbue » qui polymérise vite et une extrémité « pointue » qui polymérise plus lentement (Fig.34). La polymérisation des monomères d'actine nécessite de l'ATP, dont l'hydrolyse permet l'addition de nouveaux monomères d'actine aux extrémités. Celles-ci ne sont pas équivalentes en terme de constantes d'association d'ATP sur l'actine, et cela résulte en un 'treadmilling' du filament d'actine, un allongement progressif dissymétrique du filament.



**Fig.34 Elongation d'un microfilament d'actine.**

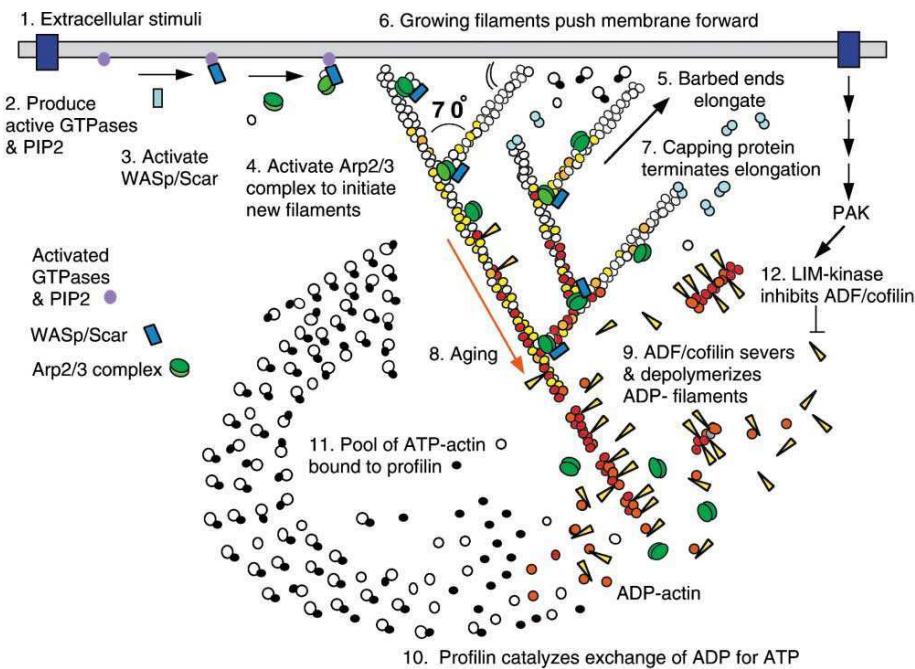
L'image de microscopie électronique montre un filament d'actine décoré de têtes de myosine et en élévation avec de l'actine-ATP.

Les constantes d'équilibre en actine-ATP diffèrent aux 2 extrémités, engendrant le processus de treadmilling.

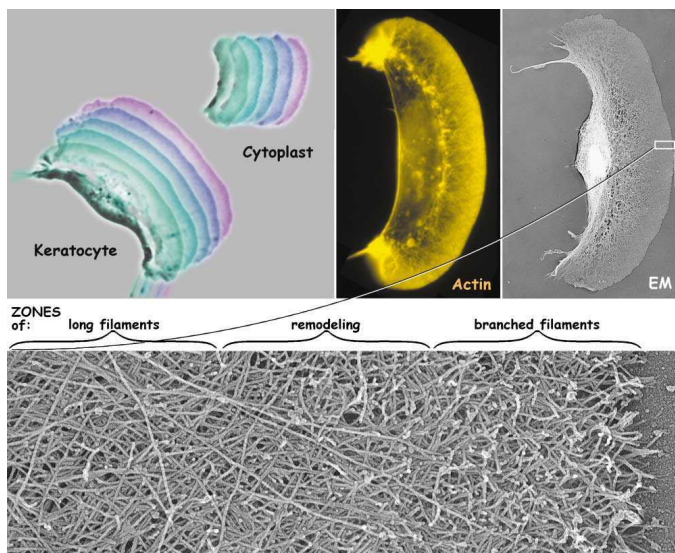
(Pollard et Borisy 2003)

La polarité intrinsèque des filaments d'actine sert à la formation des protrusions. Les protrusions peuvent être de 2 types, et dans chaque type, l'actine s'organise d'une façon particulière. Deux classes de protéines servent à nucléer la polymérisation des monomères d'actine : les protéines Arp2/3 et les protéines mDia1 et mDia2 (mammalian Diaphaneous 1/2), de la famille des formines.

Arp2/3 se lie sur les côtés d'un filament pré-existant et permet l'extension d'un nouveau filament depuis son extrémité pointue, en formant un angle de 70° avec le filament pré-existant (voir Fig.35) (Weaver et al. 2003).



**Fig.35 Nucléation et formation d'un réseau branché d'actine au front de migration d'une cellule en migration.** L'activation d'Arp2/3 est assurée par les protéines de la famille WASp/Scar/WAVE, qui sont activées au niveau de la membrane plasmique. Ces protéines interagissent avec la profiline, qui accélère la polymérisation d'actine initiée par Arp2/3 en séquestrant des monomères d'actine (Takenawa et Miki 2001). Des protéines qui coupent les extrémités des filaments d'actine et séquestrent les monomères d'actine comme la gelsoline ou le complexe ADF/cofiline inhibent la polymérisation de l'actine (Zigmond 2004), mais ce mécanisme est autant essentiel que l'assemblage des filaments pour permettre leur 'treadmilling' au front de migration (Maciver et Hussey 2002). La poussée sur la membrane, l'évènement protrusif, ne se déroulerait non pas par l'élongation des filaments d'actine, mais plutôt par un mécanisme élastique de type Brownien (Ridley et al. 2003). De l'énergie serait emmagasinée pendant l'élongation d'un filament puis cette énergie serait libérée au niveau de la membrane pour la déformer et donner une protrusion. (Pollard et Borisy 2003)

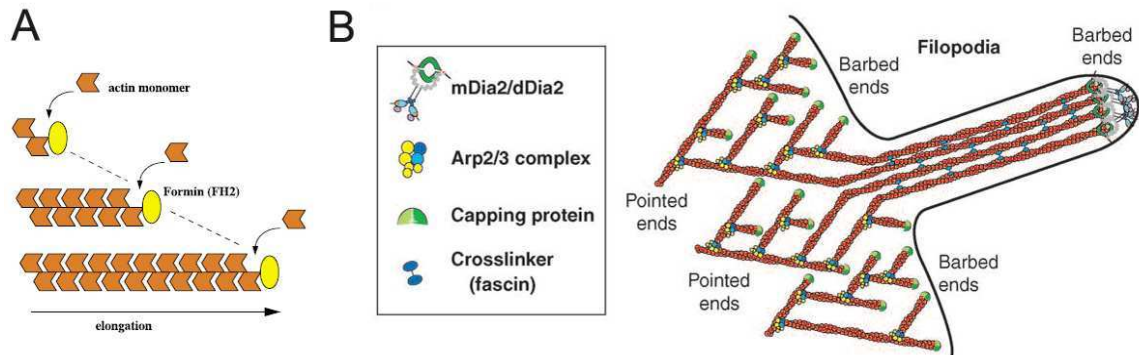


**Fig.36 Organisation du réseau d'actine dans le lamellipode d'un kératynocyte en migration**

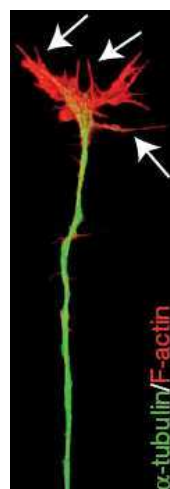
A) Superpositions de deux séries d'images en contraste de phase prises toutes les 15s illustrant la motilité d'un kératynocyte et d'un cytoplaste de kératynocyte.  
 B) Microscopie à fluorescence d'un kératynocyte marqué avec de la phalloïdine.  
 C) Microscopie électronique à Transmission d'un kératynocyte.  
 D) Détail de la région encadrée en haut à droite, montrant l'organisation des filaments d'actine dans le lamellipode. (Pollard et Borisy 2003)

Les protéines mDia1 et mDia2 catalysent une nucléation *de novo* des filaments d'actine. Les filaments d'actine résultants ne sont pas branchés comme avec Arp2/3 mais parallèles (Fig.37b). On trouve ce type de filaments dans un filopode ou une fibre de stress. Les formines possèdent un domaine FH1 (Formin Homology 1) qui leur permet d'interagir avec

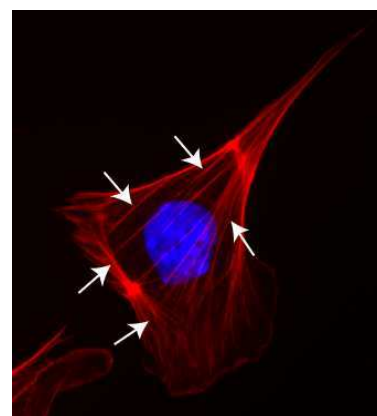
de la profiline liée à un monomère d'actine, et un domaine FH2 qui leur permet de former un échafaudage sur lequel les monomères d'actine vont s'ajouter. Les formines agissent de façon processive, et restent attachées à l'extrémité des filaments tant que des monomères d'actine sont ajoutés (Fig.37a). La présence continue des formines empêche la liaison d'autres protéines à l'extrémité du filament qui pourraient inhiber la nucléation (Xu et al. 2004 ; Romero et al. 2004 ; Kovar et al. 2006). Les formines sont régulées par les Rho-GTPases RhoA et Cdc42 pour mDia1 et mDia2, respectivement, et nécessitent une interaction avec de la profiline liée à l'actine pour stimuler la polymérisation d'actine (Watanabe et Higashida 2004).



**Fig.37** Modèle de polymérisation dite ‘processive’ d’un filament d’actine par les formines (A) et formation d’un filopode au front de migration d’une cellule en migration par l’intermédiaire de mDia2 (B) (Watanabe et Higashida 2004 ; Bukov 2006)



**Fig.38** Cône de croissance avec ses nombreux filopodes enrichis en filaments d’actine (rouge).  
Tiré de Nicol et al. 2007.



**Fig.39** Fibres de stress (flèches) d’un fibroblaste en culture.  
Rouge : Actine-F marquée à la phalloïdine.  
Bleu : Noyau marqué à la Bis-Benzimidazole

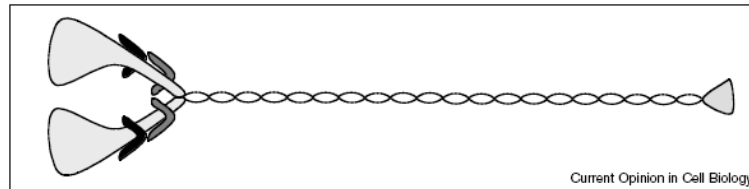
## 2.1.2 La myosine

### a- Structure et fonction

Les myosines constituent une grande superfamille de protéines qui interagissent avec l’actine, hydrolysent de l’ATP et génèrent des mouvements (Sellers 1999 ; Mermall et al. 1998). Les protéines de myosine, suivant les isoformes, sont capables de transloquer des filaments d’actine les uns par rapport aux autres, ou bien des vésicules ou d’autres compartiments par

rapport aux filaments d'actine. Les molécules de myosine II sont subdivisées en différentes classes (on en compte 15), sur la base de la séquence de leur domaine moteur. Les myosines sont constituées de 3 domaines fonctionnels distincts :

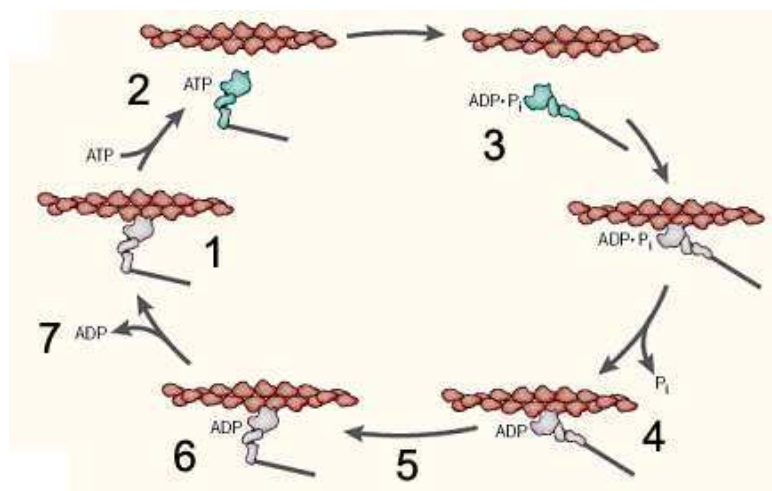
- 1) un domaine moteur qui interagit avec l'actine et lie de l'ATP,
- 2) un domaine central qui lie les chaînes légères ou la calmoduline et
- 3) un domaine de queue qui lui sert à ancrer et positionner le domaine moteur pour qu'il interagisse avec l'actine.



**Fig.40 Schéma de la myosine de type II non-musculaire.**  
(Bresnick 1999)

La myosine II non-musculaire est ainsi composée d'une paire de chaînes lourdes (200KDa), d'une paire de chaînes légères essentielles et d'une paire de chaînes légères régulatrices (RLC). Chaque chaîne lourde est composée d'une tête globulaire contenant des sites de liaison à l'actine et à l'ATP nécessaires à l'activité motrice, un domaine intermédiaire qui forme une hélice- $\alpha$  qui permet aux chaînes lourdes de dimériser, et un domaine C-terminal qui ne forme pas d'hélice. Les chaînes légères essentielles et régulatrices (RLCs) ont une structure voisine de la calmoduline et se lient au domaine moteur des chaînes lourdes (Bresnick 1999 ; Pollard et Borisy 2003).

La chaîne lourde des myosines est capable de se lier à l'actine et de subir des changements conformationnels qui vont générer un mouvement relatif de la myosine par rapport au filament d'actine (Voir Fig.41).

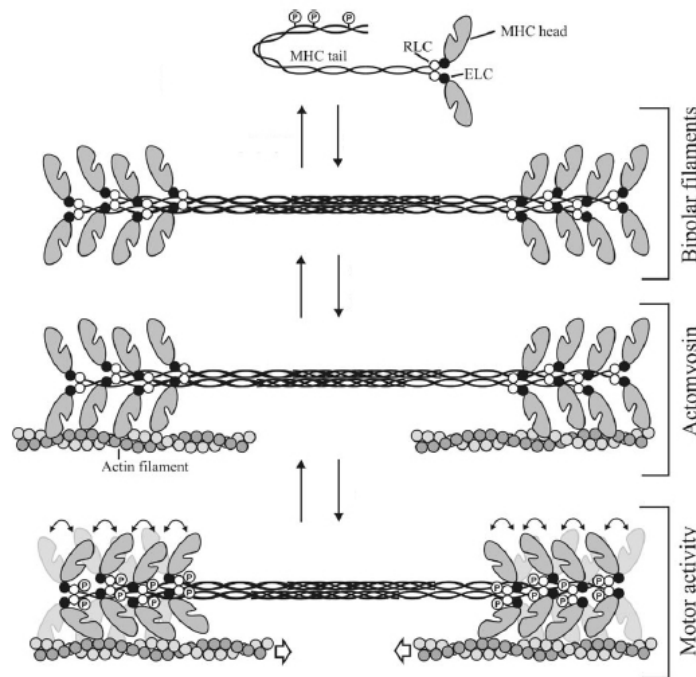


**Fig.41 Cycle de liaison de la myosine II non-musculaire à l'actine.**  
(Spudich 2001)

- 1) Si l'on débute le cycle dans l'état attaché, la tête de myosine sans nucléotide est liée à l'actine. Cet état est très bref.

- 2) Ensuite la liaison d'une molécule d'ATP sur la tête de myosine entraîne son détachement, par une modification de la conformation de la tête de myosine et une diminution de son affinité pour l'actine.
- 3) Un changement de conformation de la tête de myosine s'effectue par l'hydrolyse de l'ATP en ADP+Pi, qui restent lié à la tête de myosine.
- 4) La tête de myosine se retrouve à nouveau dans un état attaché au filament d'actine.
- 5) Cette liaison à l'actine entraîne le relâchement du Pi et
- 6) cela génère une force de traction de la tête de myosine liée à l'ADP sur le filament d'actine, par un changement de conformation de la tête de myosine.
- 7) La tête de myosine perd son ADP sous l'effet de son changement de conformation et l'on se retrouve dans l'état (1).

Les myosines de type II sont uniques par leur capacité à former des filaments bipolaires, par l'intermédiaire de leur domaine central en double hélice (Fig.42). Ces filaments possèdent une zone centrale dont les domaines moteurs sont exclus, et qui sont dédiés à tirer les filaments d'actine vers leur centre. La formation des filaments de myosine II permet en outre de stabiliser l'actine en établissant des ponts entre les filaments d'actine (Siddique et al. 2005).

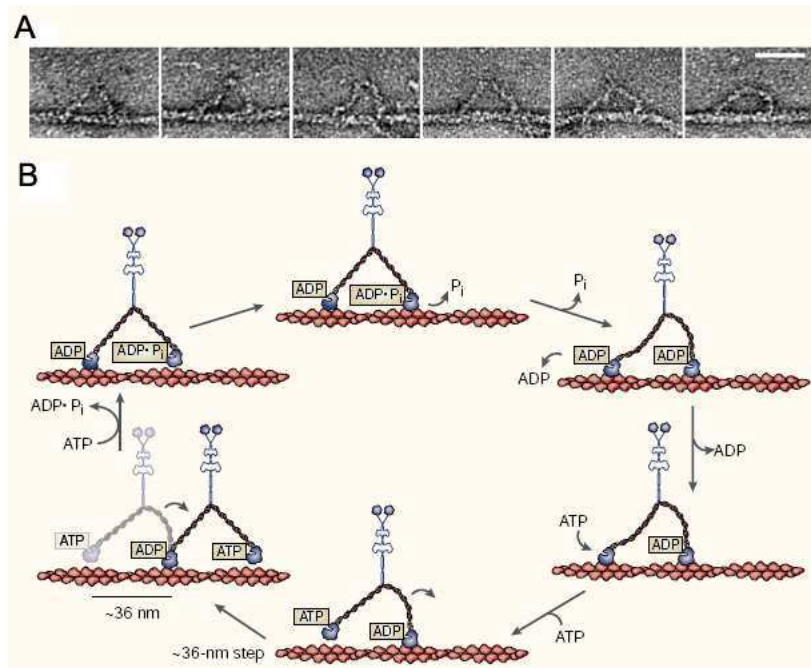


**Fig.42 Assemblage des filaments d'actine et contraction de l'acto-myosine chez *Dictyostelium*.**

MHC : chaîne lourde la myosine (Myosin Heavy Chain) ; RLC : chaîne légère régulatrice (Regulatory Light Chain) ; ELC : chaîne légère essentielle (Essential Light Chain). (Bosgraaf et Haastert 2006)

Les myosines autres que de type II ne forment pas de filaments et sont impliquées dans le déplacement de vésicules et autres cargos intra-cellulaires sur les filaments d'actine, catalysé par l'hydrolyse de l'ATP. Leurs dimensions diffèrent de celle des myosines de type II (Cheney et al. 1993). Par exemple, la myosine de type V possède un domaine central et une queue beaucoup plus longs que ceux des myosines de types II, qui lui permettent d'effectuer de grands 'pas' lors de leurs changements conformationnels pendant le cycle d'hydrolyse de l'ATP (Fig.43 ; Spudich 2001).





**Fig.43 Déplacement de la myosine de type V sur un filament d'actine.**

A) vu en microscopie électronique. B) vue schématique du cycle de liaison de la myosine V au filament d'actine et cycle d'hydrolyse de l'ATP. (Spudich 2006)

## b- Régulation de la myosine

La régulation des myosines de type II non-musculaires, comme celle des formes musculaires lisses, s'effectue par la phosphorylation des chaînes légères régulatrices (RLCs) et des chaînes lourdes. Les mécanismes de régulation des isoformes non-musculaires sont plus complexes que ceux qui se déroulent dans le muscle, où le système contractile est très stable (Horowitz et al. 1994). Les nombreuses kinases impliquées régulent à la fois son activité motrice et son assemblage en filaments (voir Fig.44) (Hartshorne et al. 2004 ; Glotzer et al. 2005 ; Somlyo et Somlyo 2005). En revanche la déphosphorylation est effectuée par une seule enzyme, la myosine phosphatase (MP).

### b1- Phosphorylation des chaînes légères régulatrices

La phosphorylation des RLCs peut premièrement s'effectuer sur leurs résidus Sérine19 (Ser19) et Thréonine18 (Thr18) (pour revues Bresnick 1999 ; Matsumura 2005). Cette phosphorylation stimule alors l'activité ATPasique de la myosine II et l'assemblage de la myosine II en filaments (Scholey et al. 1980).

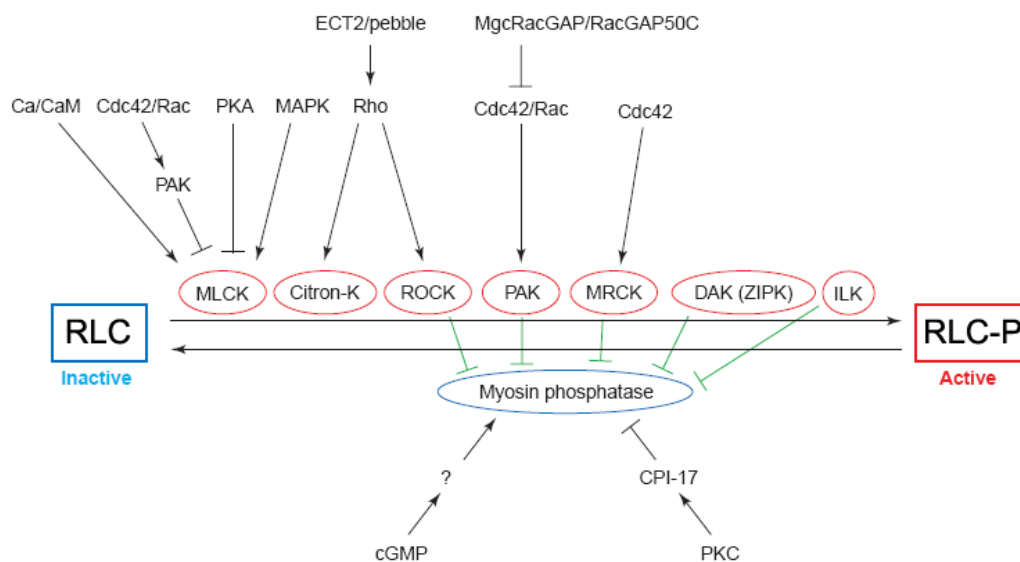
De nombreuses kinases catalysent cette phosphorylation activatrice de la RLC : la MLCK (Myosin Light Chain Kinase), régulée par la Calmoduline et par phosphorylation ; Pak (p21-activated kinase) et la MRCK (Myotonic dystrophy kinase-Related Cdc42 binding Kinase), kinases activées par Cdc42 et Rac1; la Rho-kinase p160ROCK et la citron-kinase, activées par Rho. La MLCK et p160ROCK sont responsables de la phosphorylation de la RLC à la périphérie et au centre de la cellule, respectivement (Totsukawa et al. 2000, 2004).

La PKC (proteïn kinase C) stimule la phosphorylation des RLCs sur leur résidus Sérine1/2 et sur la Thr9, mais cette phosphorylation inhibe l'activité ATPasique de la myosine II et diminue l'affinité des RLCs pour la MLCK. D'autres kinases phosphorylent aussi les RLCs : les kinases ILK (Integrin Linked-Kinase) et les DAPKs kinases (Death-Associated Protein Kinases), qui incluent la ZIPKinase.

La protéine Pak joue un rôle important dans la régulation de la dynamique de l'actine et de l'adhésion. Une migration cellulaire efficace nécessite l'adhésion aux intégrines pour générer des forces de traction au niveau du corps cellulaire et du front de migration, mais les adhésions doivent être dynamiques pour permettre leur détachement à l'arrière de la cellule lors de sa rétraction. Pak régule le turn-over des adhésions focales, en interagissant avec  $\beta$ PIX et GIT1 (Harden et al. 1996 ; Manser et al. 1997). De plus, Pak active la LIM-kinase qui inactive la cofiline.

## b2- Déphosphorylation des chaînes légères régulatrices

La déphosphorylation des RLCs est effectuée par la phosphatase de la chaîne légère de la myosine (MLCP). La MLCP est inhibée par de nombreuses kinases activatrices de la RLC (pour revue Somlyo et Somlyo 2003 ; Hartshorne et al. 2004). Par exemple, la Rho-kinase p160ROCK active la myosine II par deux voies : une stimulation directe par phosphorylation de la RLC, et une stimulation indirecte par phosphorylation de la MLCP. Ainsi, l'activation des RLCs s'effectue de façon directe par sa phosphorylation et de façon indirecte par phosphorylation de la MLCP. L'inactivation des RLCs ne s'effectue en revanche que par l'intermédiaire de la MLCP.



**Fig.44** Vue schématique de la régulation complexe de la chaîne légère régulatrice (RLC) de la myosine II. (Matsumura 2005)

Ajoutons que les chaînes lourdes peuvent être également phosphorylées. Ces phosphorylations sont effectuées par la PKC et la casein-kinase II et inhibent l'assemblage de la myosine IIb en filaments (Bresnick 1999).

## c- Rôle des myosines non-musculaires IIa et IIb dans la migration cellulaire

Les myosines II de type non-musculaire sont ubiquitaires. Il existe trois isoformes de myosine II non-musculaire (a, b et c), qui se distinguent par leur chaîne lourde, et qui présentent des activités ATPasiques, des taux de contraction et des localisations sub-cellulaires différentes (Katsuraguwa et al. 1989 ; Shohet et al. 1989 ; Takahashi et al. 1992 ; Kolega et al. 1998 ; Simons et al. 1999 ; Sellers et al. 2000 ; Golomb et al. 2004). Les différentes isoformes de la

myosine II possèdent en outre des distributions tissulaires et des fonctions distinctes, en particulier durant le développement (Murakami et al. 1993; Maupin et al. 1994 ; Kelley et al. 1996; Kolega 1998 ; Uren et al. 2000 ; Kolega 2003 ; Conti et al. 2004; Kim et al. 2005).

Les souris KO pour la myosine IIa présentent une léthalité embryonnaire très précoce (vers E6 ; Conti et al. 2004), léthalité un peu plus tardive pour les souris KO pour la myosine IIb (vers E16 ; Tullio et al. 2001). Les animaux KO pour la myosine IIb présentent des défauts au niveau du cœur et du cerveau, deux organes riches en cette isoforme (Uren et al. 2000 ; Ma et al. 2004). En particulier une hydrocéphalie sévère se met en place à la fin de la période embryonnaire pour finalement détruire toute la structure cérébrale (Tullio et al. 2001). Cette hydrocéphalie est due vraisemblablement à des défauts d'adhésion, avec un neuroépithélium qui envahit le canal spinal et obstrue le passage du liquide céphalo-rachidien. Ces défauts de mise-en-place de ces structures sont récupérés par une ré-expression de la NMHC II-B qui récupère aussi l'hydrocéphalie (Kim et al. 2007). La myosine IIc quant à elle joue un rôle important dans l'adhésion et la cytokinèse (Jana et al. 2006), mais l'étude du KO n'a pas encore été réalisée.

Les myosines IIa et IIb contrôlent la migration cellulaire, en contrôlant la régulation des protrusions, la dynamique d'adhésion et la polarité dans les cellules en migration (voir Fig.45). A l'échelle cellulaire, la myosine IIa inhibe la migration cellulaire alors que la myosine IIb la stimule.

Les deux isoformes peuvent décorer les mêmes filaments d'actine et participer à un processus commun, ou bien être localisées dans des régions subcellulaires distinctes et participer à des fonctions spécifiques. Par exemple, les myosines II participent à la formation des fibres de stress (Wei et Adelstein 2000 ; Bao et al 2005) et contrôlent la formation et la stabilité des protrusions à distance (Vincente-Manzanares et al. 2007 ; Lo et al. 2004). Au niveau des protrusions, la myosine IIa est en outre impliquée dans la régulation du flux rétrograde d'actine (Cai et al. 2006). Les myosines IIa et IIb contrôlent la mise-en-place et le désassemblage des adhérences, plutôt par un effet indirect (Vincente-Manzanares et al. 2007). La mise-en-place des nouvelles adhérences au front de migration est sous le contrôle de la myosine IIb puis la maturation de ces adhérences passe par le contrôle des deux isoformes. Au centre de la cellule, la myosine IIa contrôle la dynamique et la taille des adhérences. A l'arrière de la cellule, la myosine IIa participe à la rétraction et au désassemblage des adhérences par un mécanisme dépendant de la voie Rho (les défauts de rétraction lorsqu'on inactive la myosine IIa sont similaires à ceux observés avec des inhibiteurs de p160ROCK; Worthylake et al. 2001).

La polarité de la cellule est uniquement contrôlée par la myosine IIb. Celle-ci est nécessaire pour établir la polarité avant-arrière de la cellule et positionner le centrosome, l'appareil de Golgi et le noyau suivant l'axe de polarité de la cellule. Ceci s'effectue grâce à l'établissement d'un réseau branché d'actine (Vincente-Manzanares et al. 2007).

La myosine IIa permet un couplage entre l'actine et les microtubules. En conditions normales, la myosine IIa stimule la dynamique des microtubules et régule négativement les remodelages membranaires. L'absence ou l'inactivation de la myosine IIa entraîne une stabilisation des microtubules, leur incorporation dans les lamellipodes, une activité membranaire importante et une augmentation de la migration dans de nombreux types cellulaires (Even-Ram et al. 2007).



En outre, dans des cellules de neuroblastome, les isoformes IIa et IIb contrôlent respectivement la rétraction et la croissance neuritiques (Wylie et Chantler 2003), et d'autre part la régulation des deux isoformes dans des fibroblastes n'est pas similaire : la Rho-kinase p160ROCK régule préférentiellement la myosine IIa (Sandquist et al. 2006).

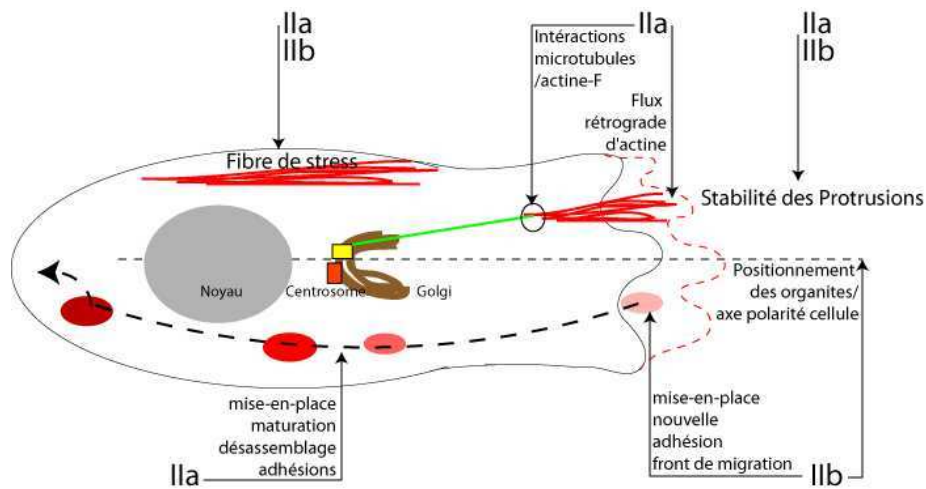


Fig.45 Schéma des rôles des myosines IIa et IIb dans la migration cellulaire.

### 2.1.3 Contrôle du cytosquelette d'acto-myosine par les RhoGTPases durant la migration cellulaire

Les Rho-GTPases Rho, Cdc42 et Rac sont exprimées de façon ubiquitaire et agissent comme des interrupteurs moléculaires pour contrôler des voies de signalisation. Elles agissent en oscillant de manière cyclique entre des formes inactives liées au GDP, et des formes actives liées au GTP (Fig.46). Liées au GTP, elles interagissent avec des effecteurs pour entraîner de nombreuses réponses intra-cellulaires. La conversion entre les formes liées au GDP et les formes liées au GTP est assurée par des GEFs (Guanine nucleotide-Exchange Factor), une large famille de protéines (plus de 85) qui stimulent l'échange de GDP par du GTP. Les GAPs (GTPase-Activating Protein), une autre grande famille de protéines, stimule l'activité GTPasique intrinsèque des Rho-GTPases (Bernards 2003 ; Raftopoulou et Hall 2004 ; Hall 2005).

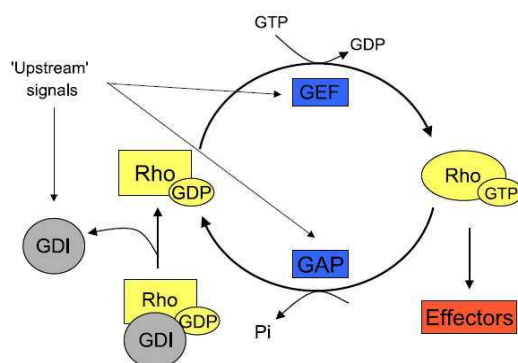


Fig.46 Le cycle des Rho-GTPases. (Raftopoulou et Hall2004)

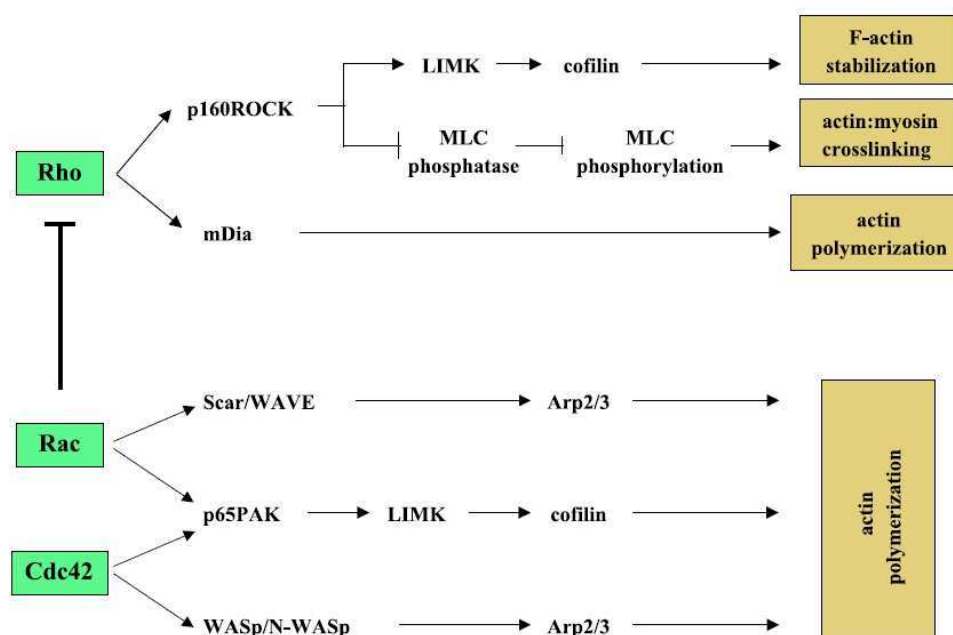
L'étude des Rho-GTPases a surtout été réalisée par des approches d'expression de formes constitutivement activées ou inactivées (on parle alors de dominant-négatif). Les Rho-GTPases, de par leur fonctionnement cyclique et leur recrutement à des localisations

différentes dans une cellule, vont permettre de mettre en place des déformations intégrées de l'architecture cellulaire dans l'espace et dans le temps, et ainsi de faire se mouvoir une cellule. Les Rho-GTPases interagissent entre elles : par exemple Rac et Rho suivent approximativement des distributions inverses aux 2 pôles d'une cellule en migration, et l'expression d'une forme constitutivement activée de Rac inhibe Rho dans de nombreux types cellulaires, du fibroblaste au neurone (Sander et al. 1999).

Les Rho-GTPases sont des régulateurs des filaments d'actine en réponse à des facteurs extracellulaires (voir Fig.47) (Bishop et Hall 2000).

Les Rho-GTPases Rac1 et Cdc42 sont toutes deux requises au front de migration d'une cellule pour y stimuler la polymérisation d'actine et y induisent la formation de lamellipodes et de filopodes, respectivement (Nobes et Hall 1995). En outre, deux voies de signalisation ont été bien étudiées en aval de Rac : la voie de la PI3-Kinase et ses produits les PI(3,4,5)P3, et la voie p130Cas/CrkII/DOCK180 (Raftopoulou et Hall 2004). Les cibles de Rac1 et Cdc42 sont essentiellement les protéines Pak, impliquées dans la motilité des fibroblastes et d'autres types cellulaires, où elles stabilisent les microtubules et le cytosquelette d'actine au front de migration (Bokoch et al. 2003), et les membres de la famille WASp/SCAR/WAVE (Eden et al. 2002 ; Rohatgi et al. 2001).

Rho régule le système contractile d'acto-myosine au niveau du corps cellulaire et de l'arrière de la cellule pour assurer les processus de rétraction cellulaire lors de la dernière étape du cycle de migration. Rho contrôle l'assemblage et le désassemblage des adhérences focales, et s'oppose à l'effet de Cdc42 et Rac1, en stimulant le désassemblage des filaments d'actine à l'avant (Schmitz et al. 2000 ; Ridley 2001). Une cible importante de Rho est la kinase p160ROCK, qui stimule la contraction de l'acto-myosine. Rho et p160ROCK sont essentielles pour détacher l'arrière des leukocytes ou des macrophages (Alblas et al. 2001 ; Nobes et Hall 1999). La kinase p160ROCK peut activer la LIM-kinase et ainsi stabiliser les filaments d'actine (Maekawa et al. 1999 ; Sumi et al. 2001).

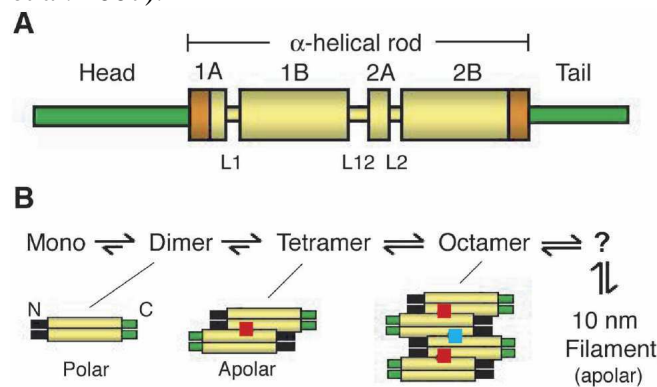


**Fig.47 Contrôle du cytosquelette d'actine par les Rho-GTPases.**  
(Raftopoulou et Hall 2004)

## 2.2 Les filaments intermédiaires

### 2.2.1 Classification et structure des filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont divisés en 3 groupes selon leur mode d'assemblage : les kératines, les protéines de type vimentine et les lamines. En dépit des nombreuses protéines qui composent les filaments intermédiaires, tous possèdent une longue hélice- $\alpha$  très conservée, la tige, flanquée d'une tête (en N-ter) et d'une queue (en C-ter) qui varient fortement (Fig.48). Celles-ci s'assemblent en parallèle pour former un dimère. Deux dimères s'assemblent latéralement de façon antiparallèle avec un décalage de moitié, pour former un tétramère. Les tétramères s'alignent et forment un filament intermédiaire, de 10 à 12 nm de long non-polarisé, contrairement aux microfilaments d'actine ou aux microtubules (Herrmann et al. 2007).



**Fig. 48 Assemblage des filaments intermédiaires**

**A-** Représentation schématique de la structure en 3 domaines partagée par toutes les protéines des filaments intermédiaires.

**B-** Assemblage des protéines de filaments intermédiaires.  
(Kim et Coulombe 2007)

Une fois synthétisées, les protéines de filaments intermédiaires sont très stables, et possèdent une longue période de demi-vie, bien qu'elles puissent être rapidement dégradées par le protéasome (Kim et Coulombe 2007). Alors que les filaments intermédiaires cytoplasmiques sont très dynamiques, les lamines, sitôt incorporées dans la lamina nucléaire, restent en place pour composer un réseau moléculaire stable (Goldman et al. 1992 ; Moir et al. 2000 ; Helfand et al. 2003 ; Windoffer et al. 2006).

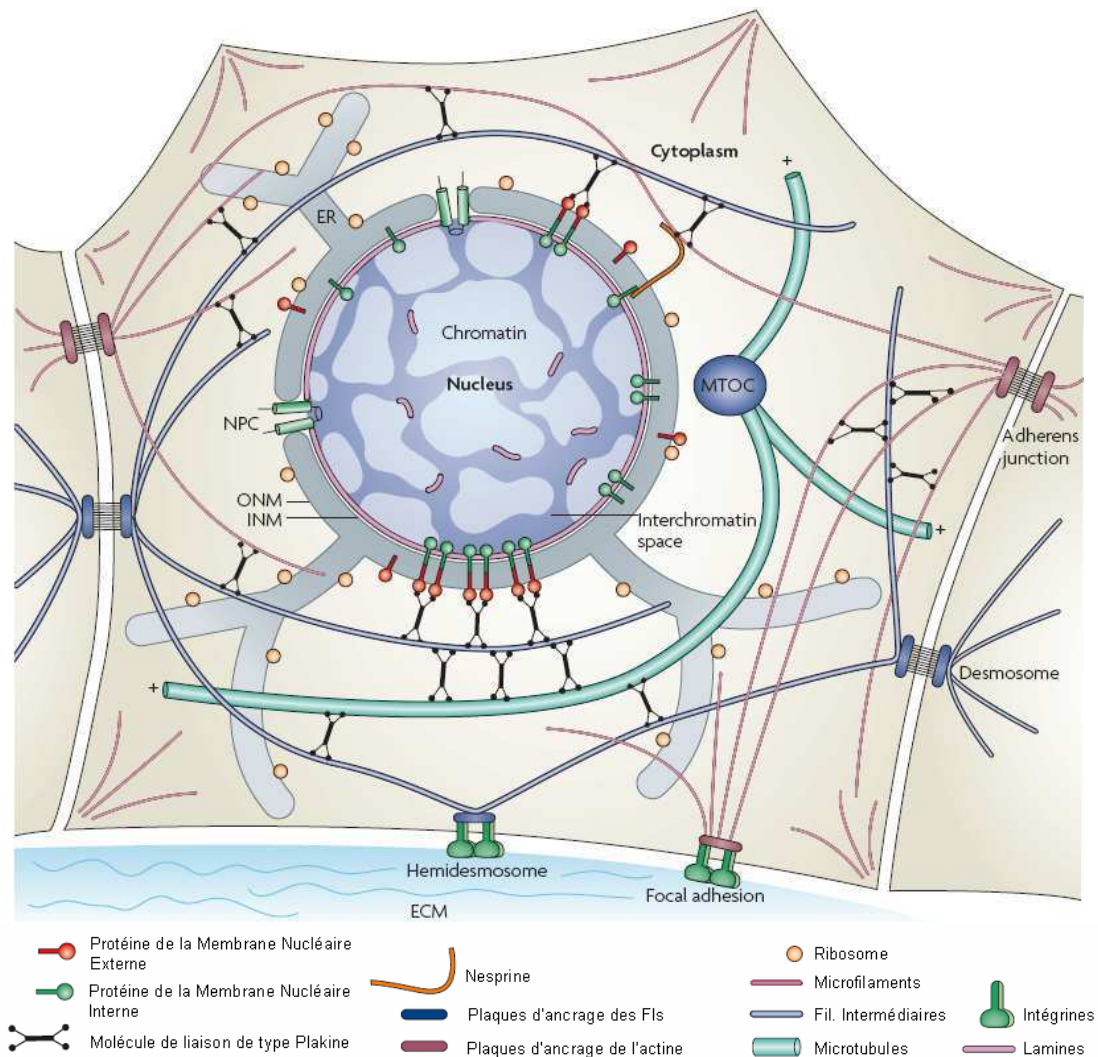
### 2.2.2 Rôle des filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont absents chez les levures, chez la drosophile ou bien certaines lignées cellulaires de mammifères (Kim et Coulombe 2007). Dans les cellules animales, ils semblent importants pour résister aux contraintes mécaniques.

La plupart des cellules de métazoaires possèdent deux réseaux de filaments intermédiaires : i) un réseau à l'intérieur du noyau, attaché à la membrane nucléaire interne ii) un réseau cytoplasmique, qui lie les complexes jonctionnels intercellulaires situés au niveau de la membrane plasmique à la membrane nucléaire externe (Fig.49).

Les filaments intermédiaires cytoplasmiques représentent un facteur majeur de stabilisation de la forme des cellules (Goldman et al. 1996). Dans le noyau, le système des filaments intermédiaires est formé de lamines qui, avec des protéines transmembranaires et des protéines qui lient la chromatine, constituent la *lamina* nucléaire (Gruenbaum et al. 2004). Celle-ci participe ainsi à la formation de l'hétérochromatine et permet l'assemblage de nombreuses protéines nucléaires. De plus, la *lamina* lie, par l'intermédiaire de son domaine SUN, des protéines de la membrane nucléaire externe de la famille de la nesprine, qui elles-mêmes se lient directement ou indirectement via des moteurs moléculaires comme les

dynéines aux microtubules (Malone et al. 2003), aux microfilaments (Zhen et al. 2002) ou aux filaments intermédiaires (Wilhelmsen et al. 2005). Ce système cytosquelettique est impliqué dans le positionnement du noyau ou des mitochondries (Jefferson et al. 2004).



**Fig. 49 Organisation des filaments intermédiaires dans les cellules de métazoaires**  
(Herrmann et al. 2007)

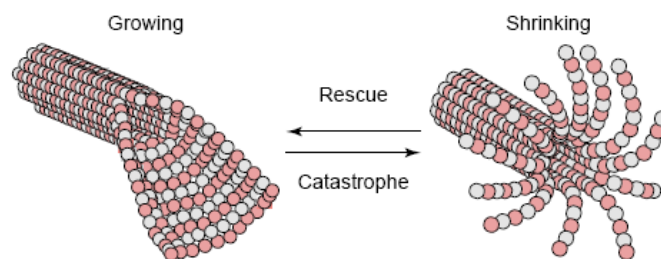
Certains filaments intermédiaires participent dans l'adressage spécifique de protéines dans des cellules polarisées (Wald et al. 2005 ; Oriolo et al. 2006). Enfin, les protéines des filaments intermédiaires interagissent avec des kinésines, des dynéines (Helfand et al. 2004 ; Betz et al. 2006) et avec des myosines (Jazwinska et al. 2003), et ceci participe à la coordination des 3 systèmes cytosquelettiques.

Aucune étude pour le moment n'attribue de rôle aux filaments intermédiaires dans la migration cellulaire.

## 2.3 Les microtubules

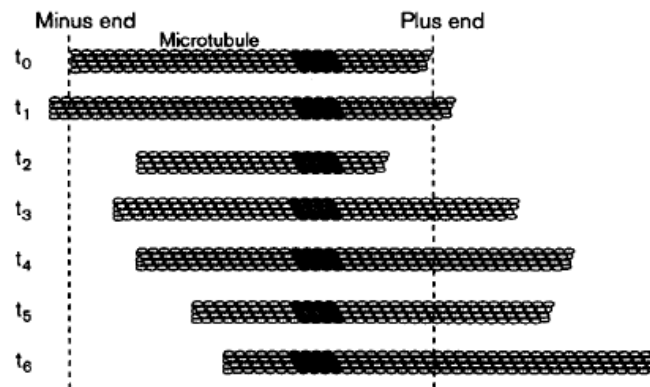
### 2.3.1 Structure des microtubules

Les microtubules sont des tubes composés de 13 protofilaments de dimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ , organisés de façon tête-bêche. Les microtubules sont nucléés depuis leur extrémité moins (-) au niveau de Centres Organisateur des Microtubules (MTOCs). Dans les cellules animales, le principal MTOC est situé au niveau du centrosome. Les extrémités plus (+) des microtubules alternent entre des phases de décroissance et croissance (on parle d'instabilité dynamique), par des phénomènes de catastrophe et de sauvetage (rescue), pour explorer l'espace intracellulaire (Fig.50) (Kirschner et al. 1986a,b). La polymérisation des microtubules nécessite du GTP, qui sera hydrolysé lors de l'incorporation des dimères de tubuline dans le microtubule en croissance. On observe ainsi une coiffe de GTP à l'extrémité des microtubules.



**Fig.50 L'extrémité (+) d'un microtubule alterne entre des phases de croissance et des phases de raccourcissement, selon le processus d'instabilité dynamique.**

Les microtubules en croissance forment un feuillet ouvert de polymères de tubuline contenant des hétérodimères de tubuline associés au GDP et associés à de la tubuline $\beta$ -GTP à leur extrémité (une coiffe de GTP). Pendant le raccourcissement, les extrémités (+) des microtubules possèdent des protofilaments incurvés qui s'éloignent de la paroi du microtubule. (Watanabe et al. 2005)



**Fig.51 Le modèle du 'treadmilling' des microtubules.**  
Au cours du temps ( $t_0$  à  $t_6$ ), l'instabilité dynamique entraîne un allongement de l'extrémité (+) et un raccourcissement de l'extrémité (-). (Jordan et Wilson 1998)

L'instabilité dynamique permet aux microtubules d'être capturés à des localisations bien précises dans la cellule (les kinétochores par exemple lors de la mitose, ou bien à la membrane plasmique pendant la migration cellulaire). Ce mécanisme de recherche-capture des microtubules est important pour la mise en place d'un réseau dissymétrique dans la cellule et pour maintenir sa forme (Kirschner et al. 1986 ; Schuyler et al. 2001).



### 2.3.2 Modifications post-traductionnelles de la tubuline

La tubuline subit des modifications post-traductionnelles spécifiques qui peuvent réguler la stabilité des microtubules et contrôler des fonctions cellulaires précises, notamment dans les neurones :

#### a- Acétylation, palmitoylation, polyglycylation et phosphorylation

La tubuline- $\alpha$  peut subir une **acétylation** catalysée par une acétyltransférase. Récemment, l'acétylation de la tubuline a été impliquée dans l'interaction des microtubules avec une kinésine (Reed et al. 2006). La réaction inverse, réalisée par une déacétylase (HDAC6 et SIRT2), se produit lors du processus de déciliation (Fan et al. 2007). Deuxièmement, la **palmitoylation** de la tubuline  $\alpha$  pourrait jouer un rôle dans l'interaction des microtubules avec le cortex cellulaire. (Caron et al. 2001). Troisièmement, la **polyglycylation** des tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  consiste en l'ajout de chaînes de Glycine (jusqu'à plus de trente résidus) sur ces résidus et est essentiellement retrouvée dans les axonèmes des organismes ciliés (Thazhath et al. 2002). Enfin, la **phosphorylation** de la tubuline  $\beta$  est associée à la différenciation et la croissance neuritique de cellules de neuroblastomes de souris (Gard et Kirschner 1985) et à la dynamique microtubulaire pendant la mitose (Fourest-Lieuvain et al. 2006).

#### b- Le cycle de détyrosination-tyrosination

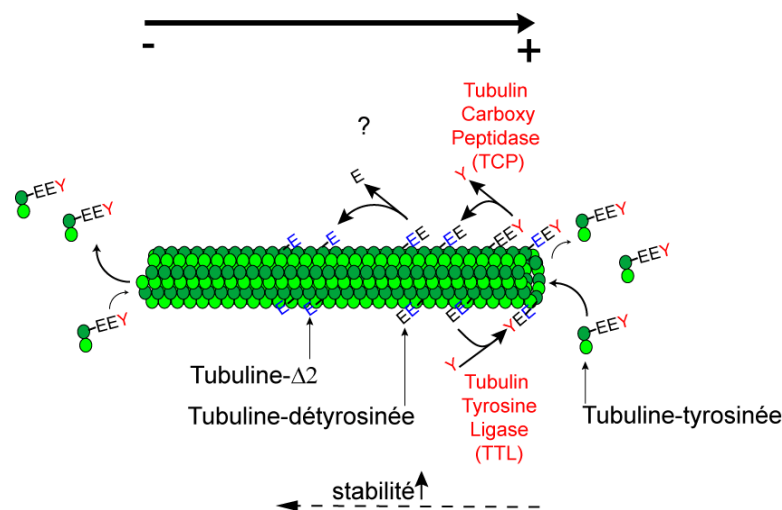


Fig.61 Le cycle de détyrosination/tyrosination de la tubuline.

L'état de la tubuline  $\alpha$  renseigne sur la dynamique des microtubules dans lesquels elle se trouve. En effet, lorsque la tubuline  $\alpha$  est incorporée dans un microtubule, elle se trouve dans l'état où elle a été synthétisée, avec en C-terminal un acide aminé aromatique de Tyrosine. La détyrosination de la tubuline est classiquement associée avec la stabilité des microtubules. En effet, si la dynamique du microtubule n'est pas importante, la tyrosine peut alors être clivée par une tubuline carboxy peptidase (TCP) conduisant à la formation de tubuline détyrosinée (Fig.61). La tubuline détyrosinée est appelée tubuline Glu car elle expose alors en C-terminal un résidu glutamate. Le glutamate C-terminal de la tubuline Glu peut être clivé à son tour par une carboxy-peptidase pour donner de la tubuline nommée  $\Delta 2$  car ne possédant plus ses deux acides aminés C-terminaux (Paturle-Lafanechère et al. 1991). La tubuline  $\Delta 2$  n'est présente, normalement, que dans les neurones où les microtubules sont très stables et où elle représente environ la moitié de la tubuline (Paturle-Lafanechère et al. 1994). A l'inverse, si la dynamique

des microtubules est importante, la tubuline Glu est le substrat de la tubuline tyrosine ligase (TTL) qui peut ajouter à nouveau de la Tyrosine en utilisant de l'ATP, et les microtubules seront composés majoritairement de tubuline-tyrosinée. L'importance fonctionnelle de ce cycle a été révélée grâce aux travaux menés dans le laboratoire de D.Job à Grenoble. Ces travaux montrent que la suppression de la TTL est un avantage sélectif important dans les cellules cancéreuses lors de la progression tumorale. Apparemment, la TTL se comporte comme un suppresseur de tumeurs. Le processus d'élimination de la TTL est général au cours de la croissance tumorale et l'apparition de tubuline  $\Delta 2$  est fréquente dans de nombreuses tumeurs humaines (Lafanechère et al. 1998). Des inhibiteurs de la TCP seraient des agents anti-cancéreux potentiels et leur étude est en cours dans le laboratoire de D.Job.

Les souris TTL  $-/-$  meurent juste après la naissance (Erck et al. 2005). Elles possèdent un cortex cérébral désorganisé avec une boucle thalamo-cortico-thalamique qui ne se développe pas. Les fibroblastes TTL  $-/-$  présentent des défauts de positionnement du noyau et du fuseau mitotique (Théry et al. 2006 ; Peris et al. 2006). D'autre part la morphologie de ces fibroblastes en culture est altérée, avec une forme plus ronde que des fibroblastes sauvages (Peris et al. 2006). Ce KO a ainsi permis de montrer que le cycle de détyrosination/tyrosination de la tubuline  $\alpha$  est impliqué dans un grand nombre de processus, de différenciation neuronale, de positionnement du noyau et de morphogénèse, en plus d'un rôle dans la progression neuronale. Il est en outre intéressant de noter que si l'activité TTL est perdue dans ces souris, il subsiste une proportion de tubuline tyrosinée, résultant de la néo synthèse de tubuline  $\alpha$  (Peris et al. 2006).

### **c- Polyglutamylatation**

La polyglutamylatation est l'ajout de chaînes de glutamate sur un résidu de glutamate situé en C-terminal des tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  (Edde et al. 1990). Les polyglutamylases appartiennent à la famille des TTLL (Tubulin Tyrosin Ligase Like) (Janke et al. 2005). Cette modification est la modification post-traductionnelle principale dans les neurones où elle contrôle l'interaction de MAPs avec les microtubules et leur organisation (Bonnet et al. 2001), ainsi que dans les axonèmes (Janke et al. 2005). Dans les cellules non-neuronales, elle est restreinte aux centrioles (Bobinnec et al. 1998a) et contrôle la mitose (Bobinnec et al. 1998b ; Regnard et al. 1999).

### **2.3.3 Agents pharmacologiques ciblant les microtubules**

La dynamique des microtubules repose sur le turn-over des dimères de tubuline à leurs extrémités. Des drogues qui perturbent l'incorporation de tubuline dans les microtubules perturbent ainsi leur dynamique.

#### **a- Les drogues qui déstabilisent les microtubules : Colchicine, Vinblastine et Nocodazole**

Des concentrations nanomolaires de colchicine, de vinblastine ou de nocodazole (Ncdz) inhibent l'instabilité dynamique et le 'treadmilling' des microtubules, les extrémités sont pour ainsi dire 'stabilisées' (Fig.62). La vitesse d'élongation et la pousse des microtubules sont alors ralenties, ce qui inhibe la migration cellulaire. Des concentrations micromolaires de ces drogues dépolymérisent les microtubules en défaisant les microtubules depuis leurs extrémités (Fig.62)(Hoebeke et al. 1976 ; DeBradander et al. 1976 ; Jordan et al. 1992 ; Liao et al. 1995 ; Dhamodharan et al. 1995 ; Vasquez et al. 1997 ; Rai et al. 1998 ; Grigoriev et al. 1999).



Ces drogues agissent en se fixant aux dimères de tubuline et en interférant avec leur incorporation ou leur stabilisation dans le microtubule en croissance. La colchicine, est un dérivé de la colchique qui se lie à l'interface des monomères de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  dans les dimères de tubuline libres ou aux extrémités des microtubules. La vinblastine et le nocodazole se lient aux dimères de tubuline sur la tubuline  $\beta$  surtout au niveau des extrémités des microtubules. Le nocodazole présente des vitesses d'association et de dissociation plus rapides que celles de la vinblastine (Hoebeke et al. 1976 ; Lee et al. 1980).

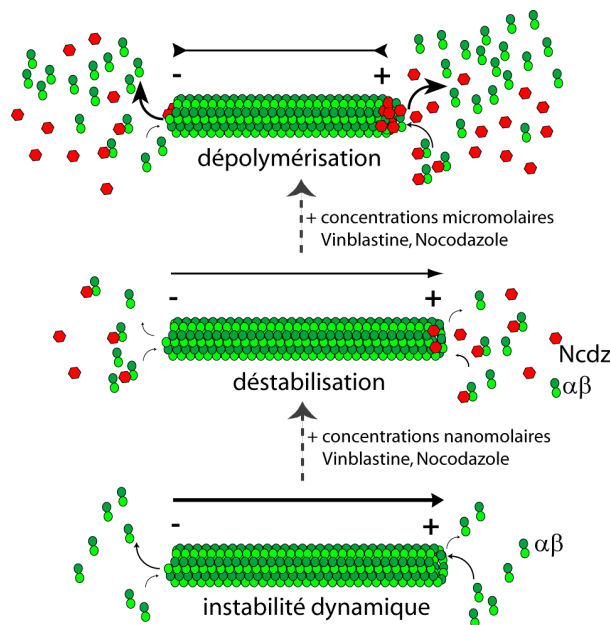


Fig.62 Mode d'action des drogues qui destabilisent les microtubules.

### b- Le Taxol, une drogue qui stabilise les microtubules

Le taxol, de la famille des taxanes, produits dérivés de l'if, inhibe le raccourcissement des microtubules et stimule leur stabilisation à des concentrations nanomolaires (Fig.63) (Derry et al. 1995), ce qui inhibe la migration cellulaire (Grogoriev et al. 1999). Le site de liaison du taxol aux microtubules paraît être situé sur la face interne des microtubules (Nogales et al. 1999). Le taxol affecte fortement les caractéristiques de polymérisation et la stabilité des microtubules. Il stimule la polymérisation des microtubules *in vitro* (Howard et Timasheff 1988 ; Schiff et al. 1979). Il est aujourd'hui largement utilisé en chimiothérapie (paclitaxel).

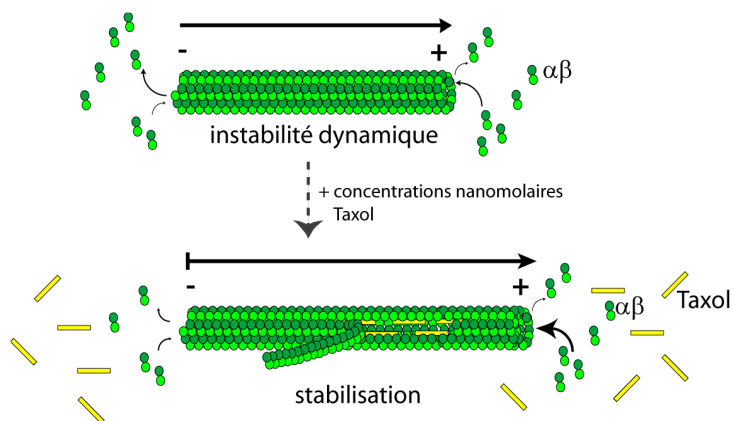
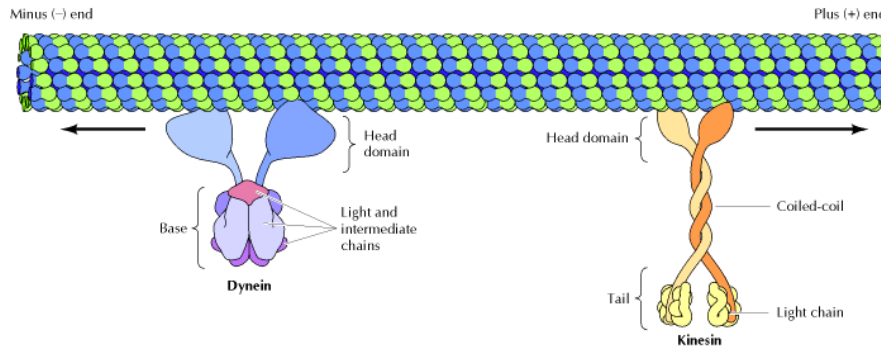


Fig.63 Mode d'action du taxol.

### 2.3.4 Les moteurs moléculaires

Dans une cellule, il existe un important trafic de compartiments vésiculaires et d'organites qui s'effectue le long des microtubules. Ces mouvements sont assurés par des moteurs moléculaires. Il s'agit des dynéines et des kinésines, qui sont en règle générale capables de se déplacer vers l'extrémité (-) ou l'extrémité (+) des microtubules, respectivement. L'hydrolyse d'ATP entraîne un changement conformationnel du domaine moteur globulaire qui est ensuite amplifié et traduit en un mouvement avec l'aide de motifs structuraux. Les autres domaines et sous unités sont responsables de la dimérisation, des régulations et des interactions avec les autres molécules (Schliwa and Woehlke 2003).

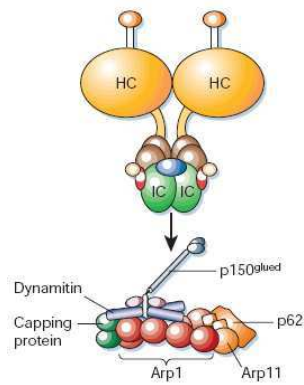


**Fig.64** Vue schématique du déplacement de la dynéine et de la kinésine le long des microtubules. (Cooper "The Cell, a molecular approach" 2000)

#### a- La dynéine

La dynéine a été initialement identifiée dans les axonèmes où elle est responsable du battement des cils et flagelles (Gibbons 1965). Plus tard, une forme cytoplasmique a été identifiée (Paschal et al. 1987). Il s'agit d'un complexe multi protéique formé de deux têtes globulaires connectées par deux tiges (Vallee et al. 1988). La dynéine contient deux chaînes lourdes, qui possèdent des domaines responsables de l'hydrolyse de l'ATP essentielle au mouvement (Gibbons and Gibbons 1987), deux chaînes lourdes, trois chaînes intermédiaires, deux chaînes intermédiaires légères et des chaînes légères (Fig.64) (King 2000). Leurs rôles respectifs ne sont pas forcément bien définis, toutefois les chaînes intermédiaires participent à l'interaction du moteur avec les organites à déplacer (Paschal et al. 1992 ; Steffen et al. 1997). Ces différentes sous-unités peuvent servir à réguler l'activité de la dynéine et il est intéressant que presque toutes ces sous-unités puissent aussi être phosphorylées, assurant un autre niveau de régulation (Dillman and Pfister 1994).

La dynéine intervient dans divers mécanismes. Elle assure premièrement un transport de compartiments vésiculaires le long des microtubules, transport rétrograde d'organelles dans les axones (Hirokawa et al. 1990 ; Vallee et al. 1988), ou transport vésiculaire des endosomes précoces vers les endosomes tardifs *in vitro* (Aniento et al. 1993) et *in vivo* (Valetti et al. 1999). De nombreuses protéines sont nécessaires pour que la dynéine se lie aux membranes (Fig.65). Les chaînes légères de la dynéine se lient à la dynactine, un complexe activateur formé principalement de la protéine p150glued et de la dynamitine, qui inhibe l'activité de la dynéine (Fig.65) (Holleran et al. 1998). L'interaction du complexe dynéine-dynactine avec les cargos vésiculaires n'est aujourd'hui pas bien comprise.



**Fig.65 Vue schématique du complexe dynéine-dynactine.**  
(Schliwa et Woehlke 2003)

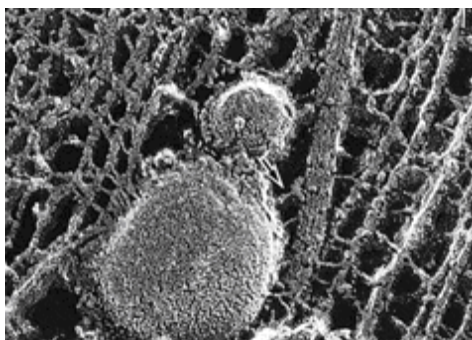
Elle assure deuxièmement un positionnement des organites intra-cellulaires. Le maintien de l'intégrité et de la localisation de l'appareil de Golgi au voisinage du centrosome dépend ainsi de la dynéine (Burkhardt et al. 1997; Harada et al. 1998 ; Rios et Bornens 2003). Chez la levure *S.Cerevisiae* (Eshel et al. 1993 ; Li et al. 1993) mais aussi chez les eucaryotes supérieurs (Reinsch et Gonczy 1998; Reinsch et Karsenti 1997), la dynéine cytoplasmique est impliquée dans les phénomènes de migration et de positionnement du noyau.

Si la dynéine est ancrée au cortex cellulaire, ses cargos peuvent être les microtubules eux-mêmes, qui sont tirés par l'activité motrice de la dynéine. Son association au cortex pourrait impliquer des protéines corticales (Num1p chez la levure (Farkasovsky and Kuntzel 2001)) et un ciblage par les bouts plus des microtubules (Dujardin and Vallee 2002).

Enfin, la dynéine serait impliquée dans la rupture de l'enveloppe nucléaire (Salina et al. 2002) et dans l'assemblage du fuseau (Heald 2000) pendant la mitose.

## **b- Les kinésines**

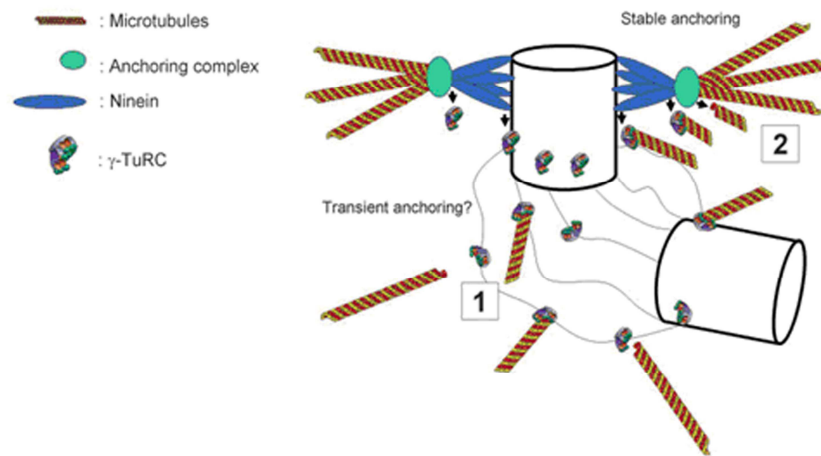
Il existe un grand nombre de kinésines (Miki et al. 2005). La nomenclature des kinésines comprend quatorze familles de kinésines (1 à 14) plus quelques orphelines (Lawrence et al. 2004). Leur structure générale comprend le plus souvent une tête globulaire qui porte l'activité ATPasique et un cou peu variable dans une même famille et une tige et une queue beaucoup plus variables (Fig.64). Alors que la tête et le cou varient peu dans une même famille, la tige et la queue varient beaucoup. Généralement, lorsque la tête est située en N-terminal, le moteur est dirigé vers le bout plus des microtubules alors que lorsque la tête est en C-terminal, le moteur est dirigé vers le bout moins des microtubules. Quelques kinésines comme KIF2A, ou bien les kinésines 13, ont leur tête située au milieu de la protéine et dépolymérisent les microtubules depuis leurs extrémités (Ogawa et al. 2004). Les kinésines participent à de nombreuses fonctions dont le transport d'organites (Fig.66), de complexes protéiques ou d'ARN messagers. Elles interviennent aussi dans les mouvements des chromosomes et du fuseau en mitose et en méiose. Quelques kinésines ont aussi la caractéristique de dépolymériser les microtubules.



**Fig.66 Microscopie électronique par empreinte à froid d'un axone de neurone murin.** Un organe membranaire est transloqué le long de microtubules auquel il est potentiellement relié par un moteur moléculaire de type kinésine (flèche).  
(Hirokawa 1998)

## 2.3.5 Le centrosome

### a- Structure du centrosome



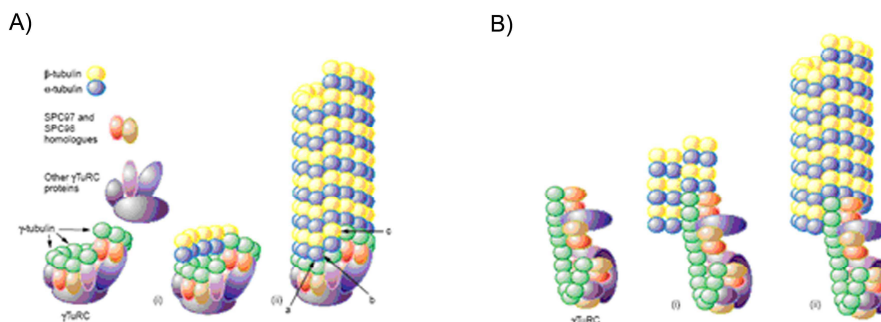
**Fig.52 Modèle illustrant l'organisation du centrosome.**  
(Delgehyr et al. 2005)

Le centrosome est formé de deux centrioles orientés le plus souvent de façon perpendiculaire, entourés d'une substance dense aux électrons, la matrice peri-centriolaire (Fig.52). Les centrioles sont des cylindres ouverts de 100-150nm de diamètre et de 100-400nm de longueur, formés de 9 triplets, doublets ou singlets de microtubules en fonction du type cellulaire, et positionnés autour d'un axe présentent une légère courbure (Delattre et Gönczy 2004).

Dans un centrosome, les deux centrioles ne sont pas équivalents sur le plan structural et fonctionnel. En effet, l'un des deux centrioles est hérité de la cellule progénitrice lors de la mitose, le centriole-père, et le second centriole est un centriole néo-formé à partir du centriole-père, le centriole-fils (Dawe et al. 2007).

### b- Nucléation et ancrage des microtubules

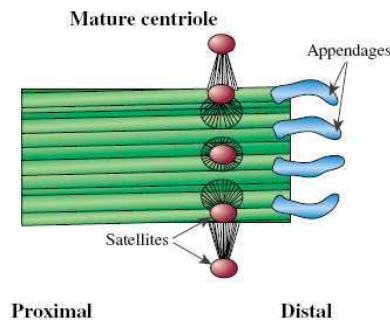
Le centrosome organise les microtubules en contrôlant les processus de nucléation et d'ancrage des microtubules. La nucléation des microtubules est assurée par un complexe macromoléculaire appelé  $\gamma$ -TuRC (pour  $\gamma$ -tubulin Ring Complex), dans lequel la  $\gamma$ -tubuline forme un tremplin moléculaire où les dimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  se positionnent et polymérisent (voir Fig.53).



**Fig.53 Les deux modèles de nucléation des microtubules par le  $\gamma$ TURC :**  
A) modèle de la matrice (template) et B) modèle du protofilament. (Job et al. 2003)

Le  $\gamma$ -TuRC est enrichi dans le centrosome, et les microtubules sont nucléés et sont ancrés transitoirement par le  $\gamma$ -TuRC ou relâchés.

Le centriole-père possède des appendices dans ses régions distale et sub-distale (Fig.54) (Paintrand et al. 1992). Les appendices distaux sont impliqués dans l'ancrage du centriole-père à la membrane plasmique pour permettre la formation d'un cil (Anderson 1972 ; Baron et Salisbury 1988) et les appendices sub-distaux servent à ancrer des microtubules (De Brabanter et al. 1982 ; Gorgidze et Vorobjev 1995 ; Lüders et Stearns 2007).



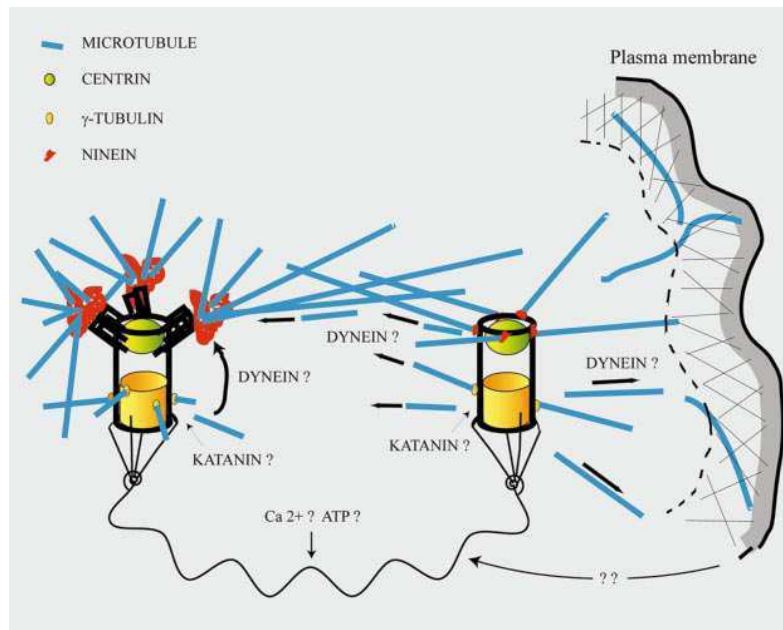
**Fig.54 Vue schématique longitudinale du centriole-père, illustrant les appendices distaux et les satellites sub-distaux.**  
(Dawe et al. 2007)

La ninéine est une protéine centrosomale concentrée dans et sur le centriole-père. Une proportion du  $\gamma$ -TuRC est concentrée au centriole-père par la ninéine. Les microtubules nucléés par ce  $\gamma$ -TuRC près ou sur les appendices sub-distaux seraient capturés rapidement par les complexes d'ancrage. La ninéine possède une activité d'ancrage des microtubules sur les centrioles. Elle possède de plus un rôle positif sur la nucléation des microtubules en recrutant le  $\gamma$ -TuRC au niveau du centrosome. Le  $\gamma$ -TuRC seul n'est pas capable d'ancrer les microtubules au centrosome en l'absence de ninéine. La ninéine représente donc un lien moléculaire entre les activités de nucléation et d'ancrage au niveau du centrosome (Delgehyr et al. 2005).

Les microtubules nucléés près de la paroi des centrioles sont relargués et transportés aux complexes contenant de la ninéine au niveau du centriole-père, ou à d'autres sites d'ancrage, principalement près ou sur la membrane plasmique.

La distance inter-centriolaire, qui pourrait dépendre du système d'acto-myosine, contrôlerait la libération des microtubules vers la périphérie de la cellule. Le centriole-père et le centriole-fils se comportent différemment durant l'interphase. Le centriole-fils est mobile dans le cytoplasme, alors que le centriole-père est quasi-stationnaire au centre de la cellule (Piel et al. 2000). Les microtubules à la périphérie pourraient contrôler le système d'acto-myosine, par une boucle de rétro-contrôle. Le lien entre les centrioles est composé de différentes protéines, et probablement régulé par le calcium (voir figure 55 ; Piel et al. 2000).

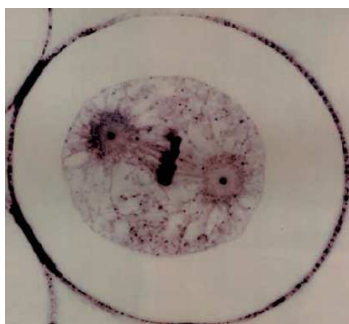




**Fig.55 Modèle du rôle de chaque centriole dans le centrosome.**  
(Piel et al. 2000)

## b- Historique et rôle du centrosome

Il existe différents sites organisateurs des microtubules (ou MTOC pour MicroTubules Organizing Center) dans une cellule, mais le plus important et le plus visible est le centrosome. Les centrosomes furent observés pour la première fois par Flemming en 1875. Le terme « centrosome » fut introduit par Boveri en 1888 pour décrire un unique « corps infime, ou plus communément une paire de corps, marqués intensément à l'hématoxyline... et surmontés par un aster cytoplasmique qui en irradie » (Fig.56). Pendant des années, on a pensé que la fonction du centrosome se limitait à sa capacité de nucléation et d'organisation du réseau de microtubules pendant l'interphase ou la mitose. Mais le centrosome est plus qu'un centre organisateur des microtubules (pour revue Rieder et al. 2001). Des travaux récents démontrent que cet organite est essentiel pour la progression du cycle cellulaire et que ce rôle est indépendant de sa capacité à organiser les microtubules. Bien que l'organisation des microtubules soit l'activité la plus visible du centrosome, elle n'est pas nécessaire pour la survie et la reproduction de cellules isolées. En effet, les réseaux de microtubules fonctionnels peuvent être organisés pendant l'interphase ou la mitose en l'absence de centrosome par des mécanismes redondants. La preuve la plus frappante est fournie par les lignées de drosophile qui ne possèdent pas de centrosome et qui sont pourtant viables (Basto et al. 2006). Le centrosome demeure malgré tout essentiel à la cellule pour son rôle dans la progression du cycle cellulaire.



**Fig.56 La découverte de Boveri en 1888.**

Une des premières images de Boveri qui montre la métaphase d'un embryon de nématode *Parascaris equorum* au stade une cellule, coloré avec de l'hématoxyline.

Les centrioles apparaissent comme de grosses structures sombres, au centre de chaque fuseau mitotique.

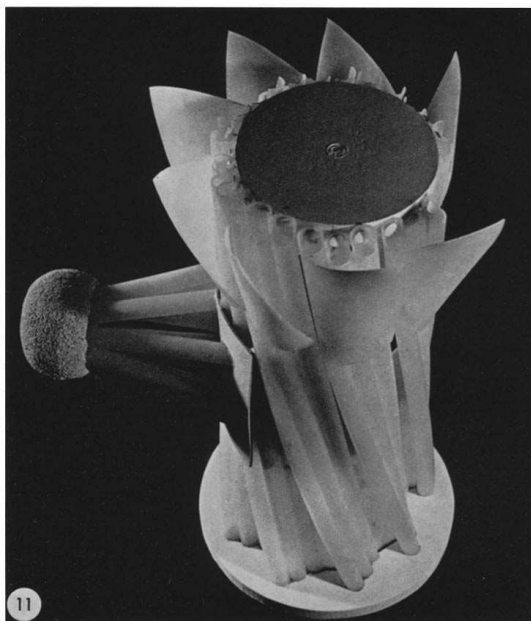
(Delattre et Gönczy 2004)

Ainsi, les centrosomes sont impliqués, entre autre, dans l'organisation des microtubules pendant l'interphase, dans la progression du cycle cellulaire, la définition de l'axe de division, le positionnement du noyau et la motilité cellulaire (Rieder et al. 2001)

### 2.3.6 Le corps basal et le cil

Les cils sont présents sur la plupart des cellules du corps humain. Ce sont des structures qui peuvent être motiles ou non motiles, présentes en un unique exemplaire ou en plusieurs. Différents mécanismes de ciliogenèse permettent la production de différents types de cils et flagelles. Plusieurs centaines de centrioles sont nécessaires pour former les cils des cellules multi-ciliées et ceux-ci peuvent être générés par des voies centriolaires ou acentriolaires. Dans le règne animal, les cils multiples sont en général motiles. Ils déplacent des protistes unicellulaires comme *Tetrahymena* et chez les métazoaires ils sont capables de déplacer du matériel comme les fluides muqueux à travers les couches de cellules épithéliales (Rieder 2001 ; Dawe 2007). Les cils uniques, encore appelés cils primaires, sont en général non motiles et sont plus largement rencontrés à la surface des cellules des mammifères (Wheatley et al. 1996).

#### a- Structure d'un corps basal, d'un cil et ciliogenèse

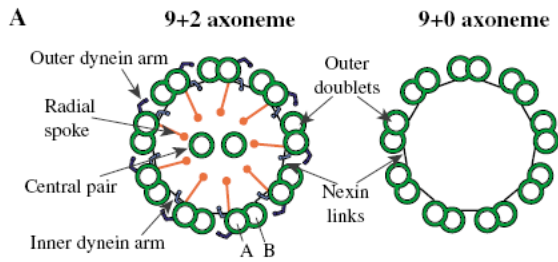


**Fig.57 Modèle 3D du corps basal.**

Reconstruction du corps basal de cellules de l'oviducte chez le singe *rhesus*, à partir de coupes sériées, obliques et tangentielles en microscopie électronique. Le modèle 3D respecte les échelles respectives des différents éléments. Les parois du corps basal sont constituées de neuf triplets de microtubules régulièrement espacés, qui courent de la base à l'apex selon un tilt vers la gauche de 10-15° d'angle par rapport à l'axe longitudinal. L'angle du triplet est de 10° à la jonction corps basal-cil. Des rubans de matériel fibreux s'étendent de la partie basale de chaque triplet pour former une radicelle striée. Un pied basal pyramidal projette à angle droit de la région médiane du corps basal. (330Å=2,5cm). (Anderson 1972)

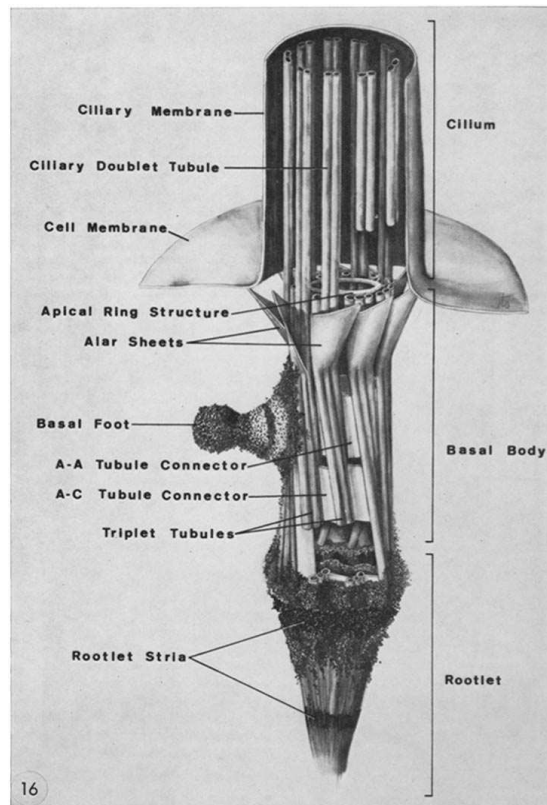
Les cils (Fig.59) sont générés à partir d'un corps basal (Fig.57), qui est une structure analogue à un centriole mitotique, selon les théories développées par Henne-guy et Lenhossek (Henne-guy et al. 1898 ; Lenhossek et al. 1898). Les cils sont formés d'un axonème central qui prolonge le corps basal et possède une structure voisine à ce dernier : un axonème est formé de 9 doublets de microtubules périphériques, alors qu'un centriole est formé de 9 triplets. Si l'axonème possède un doublet central de microtubules qui permet au cil de se déformer alors le cil est motile. Sinon, le cil est immotile et on parle alors d'un cil primaire (Fig.58 ; Katsumoto et al. 1994 ; Satir et Christensen 2007)





**Fig.58 Le cil primaire possède une structure typique en « 9+0 », qui diffère du cil motile de structure « 9+2 » (Dawe et al. 2007)**

La formation d'un cil nécessite la migration des centrioles à la surface apicale de la cellule et l'acquisition de structures accessoires. Une fois qu'un centriole s'est ancré à la membrane plasmique, il prend l'appellation de corps basal (Anderson 1972).



**Fig.59 Dessin du corps basal illustrant ses relations avec la région basale du cil et la membrane plasmique. (Anderson 1972)**

Le système d'acto-myosine contrôle la migration des centrioles dans les cellules multi-ciliées. Actine et myosine sont associées avec les centrioles et le matériel centriolaire (Klotz et al. 1986 ; Lemullois et al. 1987, 1988). Le traitement de cellules d'oviducte avec des agents qui inhibent la polymérisation de l'actine ou l'activité de la myosine (Boisvieux-Ulrich et al. 1990) inhibe la migration des centrioles. Dans le cténophore *Beroë*, les centrioles associés à des faisceaux parallèles de microfilaments d'actine (Tamm et Tamm 1988) pourraient être poussés jusqu'à la surface par ces faisceaux d'actine, par un mécanisme identique à celui de la motilité intra-cellulaire de *Listeria* (Gouin et al. 2005 ; Machesky 1999). Le rôle des microtubules est moins connu : la stabilisation des microtubules bloque la migration des centrioles durant la ciliogenèse (Boisvieux-Ulrich et al. 1990) mais la dépolymérisation des microtubules ne l'affecte pas (Boisvieux-Ulrich et al. 1989).

La famille des facteurs de transcription forkhead/wing helix contrôle la migration et/ou l'ancrage des corps basaux à la membrane plasmique. Les cellules épithéliales mutées pour un de ses membres, Foxj1, possèdent des corps basaux mais ces derniers sont incapables de s'ancrer à la membrane plasmique pour former un cil (Brody et al. 2000 ; Gomperts et al. 2004). L'ancrage des corps basaux à la membrane plasmique apicale est aussi contrôlé par des effecteurs de la voie de polarité dans le plan, comme intuned (in) et fuzzy (Fy) (Collier et Gubb 1997 ; Park et al. 2006). Enfin, la calpaïne, une protéase à cystéine qui cible l'ézrine, pourrait réguler l'ancrage du corps basal à la membrane plasmique, ce qui suggère un rôle local de la protéolyse du cytosquelette dans ce processus (Gomperts et al. 2004).

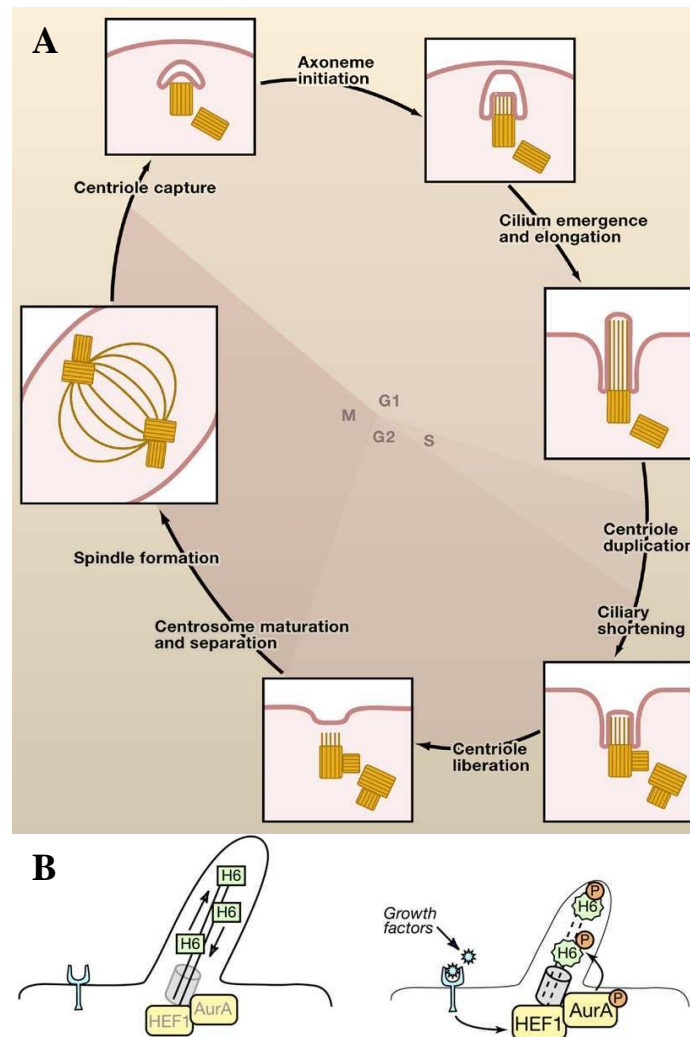
En revanche, les facteurs qui contrôlent la migration des centrioles pendant la mise en place d'un cil primaire restent inconnus. Ainsi, le contrôle de la migration des centrioles pour former un cil primaire reste une question ouverte.

### **b- Le cycle cellulaire et le cil primaire**

La ciliogenèse est un processus contrôlé par le cycle cellulaire (Rieder 2001 ; Dawe 2007 ; Satir et Christensen 2007). Les cellules multi-ciliées sont totalement différenciées. En revanche, le cil primaire peut se former dans des cellules somatiques quiescentes en G0 ou dans des cellules en prolifération en phase G1 de leur cycle (Weatley 1971 ; Tucker et al. 1979a ; Ho et Tucker 1989).

La formation du cil primaire durant l'interphase débute par l'ancrage d'une vésicule cytoplasmique à l'extrémité distale du centriole-père (voir Fig.60a). Ensuite l'axonème se forme sur le centriole-père, devenu alors corps basal, et pousse dans la vésicule qui s'agrandit en même temps pour devenir une gaine. Cette gaine peut fusionner avec la membrane plasmique, souvent au niveau d'une invagination profonde de la membrane plasmique (Sorokin et al. 1962). Dans les cellules qui ne poursuivent pas le cycle cellulaire, le corps basal s'ancre à la membrane plasmique et le cil pousse dans l'environnement extracellulaire, signe de la quiescence de la cellule. Dans les cellules qui poursuivent leur cycle, le corps basal peut s'ancrer transitoirement à la membrane plasmique ou bien rester dans une localisation intra-cytoplasmique. Durant la transition G2/M le cil se raccourcit. Ce raccourcissement est associé au décrochage du cil s'il était ancré à la membrane plasmique, et le cil peut alors emporter parfois une portion de l'axonème qui reste attaché au corps basal (Tucker et al. 1979b ; Rieder et al. 1979).

Les processus de résorption du cil primaire, son raccourcissement et son internalisation, sont réalisés par la déacétylase HDAC6, qui est activée par un échafaudage protéique mitotique. La kinase Aurora A est une kinase centrosomale qui régule le cycle cellulaire et que l'on trouve activée dans de nombreux cancers associés à des amplifications du centrosome et une instabilité génomique. Aurora A est activée par HEF-1, une protéine impliquée dans les interactions avec la matrice extra-cellulaire par l'intermédiaire des intégrines et dans les métastases. L'activation d'Aurora A par HEF-1 permet l'activation de HDAC6 et est nécessaire et suffisante au processus de résorption du cil primaire (Fig.60b ; Pugacheva et al. 2007).



**Fig.60 A) Le cycle du cil-centriole-centrosome classique, et le cycle hypothétique dans les interneurons corticaux en migration. B) Schéma hypothétique des acteurs en jeu dans le processus de dé-ciliation. (Pan et Snell 2007)**

### c- Les ciliopathies

Les cils jouent un rôle central dans l'homéostasie tissulaire, avec un rôle critique durant le développement (Scholey et Anderson, 2006 ; Caspary et al. 2007 ; Fliegauf 2007).

De nombreuses pathologies sont associées à des défauts de la ciliogenèse ou de la fonction des cils, on parle alors de ciliopathies. Les ciliopathies regroupent des symptômes très variés, qui sont le plus souvent associées à des problèmes de morphogenèse (défauts cardiaques, situs inversus), de fonction du cil (obésité ; anosmie), d'excès de prolifération (reins polykystiques) ou de défaut de prolifération (dégénérescence rétinienne). Les progéniteurs du cervelet possèdent un cil primaire dont l'absence se traduit par un défaut de prolifération du pool de progéniteurs (Chizhikov et al. 2007). Ainsi, dans un certain nombre de ciliopathies, le cervelet ne se développe pas correctement et cela entraîne une ataxie (syndrome de Joubert- Valente et al. 2006 ; syndrome de Meckel-Gruber- Smith et al. 2006 ; syndrome orofaciodigital de type 1 (OFD1)- Thauvin-Robinet et al. 2006). De plus, les ciliopathies sont souvent associées à des symptômes cognitifs pouvant aller jusqu'au retard mental, comme dans le syndrome de Bardet-Biedl. Ainsi, le cortex pourrait aussi être touché dans ces pathologies, et ses défauts

pourraient se situer aux différents niveaux de la corticogenèse : prolifération neuronale (comme dans le cervelet), différenciation des neurones, établissement des connexions synaptiques et pourquoi pas migration neuronale. L'étude des patients atteints de ciliopathies permettra sans doute de vérifier si ces individus sont porteurs de malformations du cortex.

#### **d- Le cil primaire des neurones**

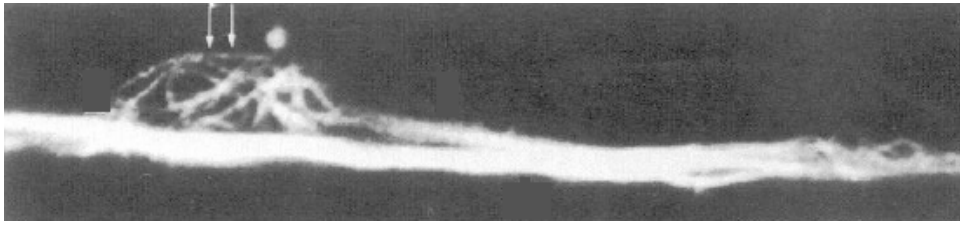
Le cil primaire porté par les neurones a longtemps été considéré comme un élément vestigial de ces cellules, sans rôle particulier (Dahl 1963; Duncan et al. 1963 ; Peters et al. 1976 ; Ruela et al. 1981 ; Bayer and Pickel 1990). Son étude est difficile car les marqueurs ciliaires comme la tubuline-acétylée (Wheatley et al. 1996) sont aussi localisés au corps cellulaire et dans les neurites (Berbari et al. 2007). Mais si le rôle du cil primaire n'est toujours pas connu, on sait qu'il porte un certain nombre de récepteurs comme les récepteurs à la somatostatine de type 3 (SSTR3) (Händel et al. 1999 ; Schulz et al. 2000 ; Stepanyan et al. 2003) et à la sérotonine de type 6 (5HTR6) (Hamon et al. 1999 ; Brailov et al. 2000). Ils expriment la petite protéine G hétérotrimérique Gαq11 qui couple beaucoup de récepteurs à 7 domaines transmembranaires (Hughes et al. 2001 ; Fuchs et al. 2003). Dans l'hippocampe, les cils primaires sont riches en adénylate-cyclase de type 3 (AC3) (Berbari et al. 2007). Les cils associés à de telles protéines présentent des distributions différentes dans le cerveau, ce qui suggère que l'hétérogénéité que l'on trouve au niveau des cils primaires correspond à une hétérogénéité fonctionnelle entre populations neuronales (Fuchs et Schwark 2004).

### **3 Organisation des microtubules dans les neurones en migration**

L'organisation du système microtubulaire dans les neurones en migration a d'abord été analysée en microscopie électronique (Rakic 1971 ; Hatten et al. 1984 ; Gregory et al. 1988). Puis des données ont été obtenues *in vitro* par des marquages immunocytochimiques (Rivas et Hatten 1995 ; Xie et al. 2003 ; Tanaka et al. 2004 ; Shu et al. 2004 ; Solecki et al. 2004 ; Toyo-Oka et al. 2005 ; Umeshima et al. 2007), et plus récemment des observations par vidéomicroscopie en temps réel avec des marqueurs fluorescents (Tsai et al. 2007).

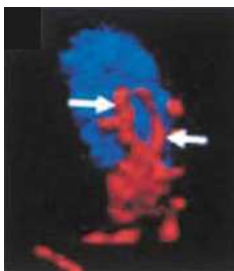
Les études de microscopie électronique ont mis en évidence la présence de microtubules orientés longitudinalement dans les neurones en migration. Les microtubules sont présents dans le soma, dans le neurite de tête et dans le processus arrière (Rakic 1971 ; Hatten et al. 1984 ; Gregory et al. 1998 ; Schaar et McConnell 2005). Dans les neurones de cervelet en migration radiale, l'extrémité (+) des microtubules pointe vers l'avant dans le processus de tête, et la polarité des microtubules dans le processus arrière est mixte (Rakic et al. 1996). Devant le noyau, les microtubules irradient des centrioles. L'un de ces centrioles est un corps basal qui peut former un cil intra-vésiculaire dans le cytoplasme (Hatten et al. 1984 ; Schaar et McConnell 2005) ou bien être ancré à la membrane (Rakic 1971 ; Gregory et al. 1988). Le noyau des neurones en migration est allongé et bilobé (Rakic 1971 ; Hatten et al. 1984 ; O'Rourke et McConnell 1995 ; Shaar et McConnell 2005). Les microtubules se localisent sous la membrane plasmique du soma de grains en migration (Gregory et al. 1988) et peuvent être tangents à la membrane nucléaire voire capables par endroits de déformer le noyau de neurones de la zone sous-ventriculaire en migration (Shaar et McConnell 2005).

La cage péri-nucléaire de microtubules fut mise en évidence par Rivas et Hatten en 1995 qui observèrent dans le soma des neurones de cervelet une organisation des microtubules en cage autour du noyau (Fig.67)



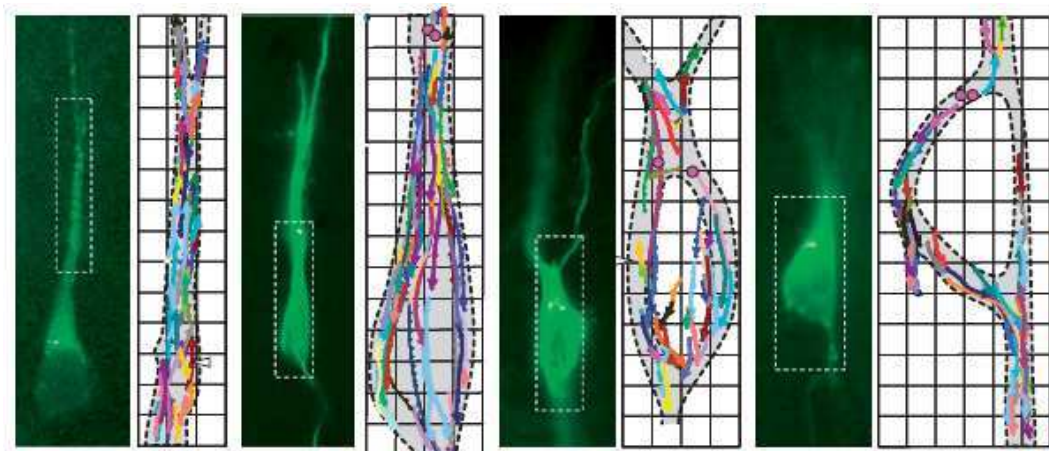
**Fig.67 Cage péri-nucléaire de microtubules –flèches) dans un grain du cervelet en migration.**  
Marquage à la  $\beta$ -tubuline. (Rivas et Hatten 1995)

Cette cage péri-nucléaire de microtubules dans les neurones en migration a été observée de nombreuses fois (Tanaka et al. 2004b ; Solecki et al. 2004 ; Shu et al. 2004). Cette organisation semble être la règle, bien qu'une fourche de microtubules ait été décrite dans des neurones corticaux en migration (Fig.68 ; Xie et al. 2003).



**Fig.68 Fourche de microtubules devant le noyau d'un neurone cortical embryonnaire.**  
Noyau en bleu (Hoescht), Tubulin- $\beta$ III en rouge. (Xie et al. 2003)

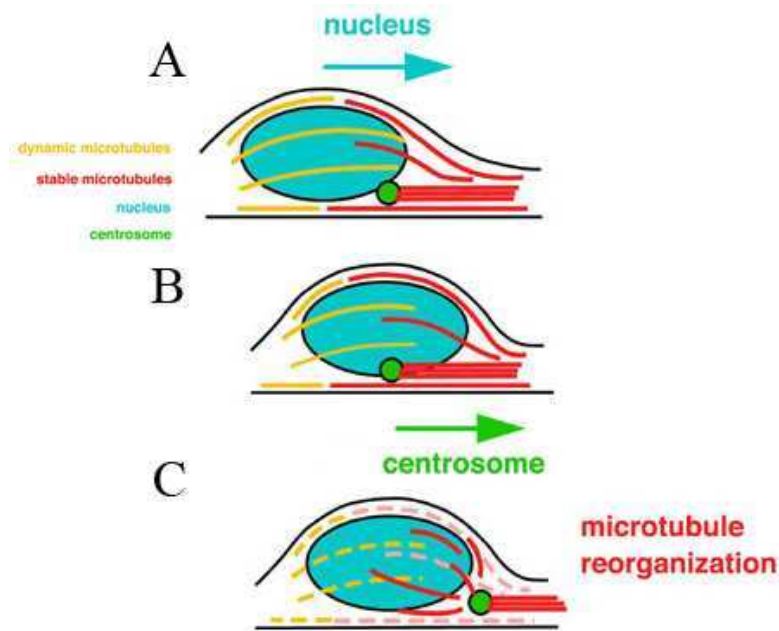
L'organisation dynamique des microtubules a été étudiée récemment par le groupe de Richard Vallee (Fig.69 ; Tsai et al. 2007). Ce travail a été réalisé *in vitro* sur des neurones corticaux en migration radiale. Des électroporations *in utero* des protéines EB3 et Centrine2 couplées à la GFP ont permis de démontrer que les microtubules s'allongent à taux constant dans les parties proximales et distales des neurones en migration, avec une vitesse légèrement supérieure vers le cône de croissance par rapport au reste de la cellule. Cette étude a mis en évidence une orientation des microtubules similaire à celle décrite dans les travaux précédents. L'unidirectionnalité des microtubules à l'arrière du centrosome est en revanche différente des résultats dans les grains obtenus par Rakic, qui avait observé des microtubules bi-directionnels (Rakic et al. 1996).



**Fig.69 Dynamique de croissance des microtubules dans un neurone cortical en migration radiale.** Sont illustrés les 'chemins' des extrémités (+) des microtubules, marqués avec la protéine EB3-GFP. (Tsai et al. 2007)

Très récemment ont été décrits deux réseaux de microtubules localisés dans le soma des neurones de cervelet en migration :

- une cage péri-nucléaire constituée de microtubules dynamiques (marquages tubuline-tyrosinée);
- une fourche de microtubules stables qui émane du processus avant et se positionne sur la partie antérieure du noyau (marquages tubuline-acétylée ; Figure 70).



**Fig.70 Séquence de migration d'un neurone et réorganisation des microtubules.**

A-B Translocation du noyau

B-C Migration du centrosome dans un neurite, qui s'accompagne d'une réorganisation des microtubules.

(Umeshima et al. 2007)

Ainsi, les différences d'organisation des microtubules (en cage ou en fourche) autour du noyau pourraient être dues soit aux types cellulaires étudiés, à leur état migratoire et au système de culture employé, ou bien pourraient refléter des différences méthodologiques de détection des microtubules (marquage de la tubuline- $\beta$ III VS tubuline-tyrosinée/détyrosinée/acétylée). Notre étude en tomographie électronique a permis de confirmer certains résultats obtenus jusqu'à présent dans l'analyse de l'organisation des microtubules, et d'apporter de nouveaux éléments quant à l'ultrastructure du centrosome et l'ancrage des microtubules sur celui-ci dans les neurones en migration (Baudoin et al. *en préparation*).

## 4 Le couplage entre le noyau et le centrosome dans les neurones en migration et son contrôle

### 4.1 La mise en évidence d'un couplage physique entre le noyau et le centrosome

La nucléokinèse des neurones en migration est saltatoire, et il se produit un découplage spatial cyclique, plus ou moins important selon la migration est radiale ou tangentielle, entre le noyau et le centrosome. Le centrosome migre vers l'avant de façon continue, alors que le noyau alterne des phases de translocation rapide et des phases de pause (Solecki et al. 2004 ; Bellion et al. 2005 ; Tsai et al. 2007). Ainsi, le noyau et le centrosome se trouvent couplés (associés) à certaines phases du cycle, et découplés (dissociés) à d'autres. Ce phénomène semble



hautement régulé, car la distance entre le noyau et le centrosome, lorsqu'ils sont découplés, varie peu dans chaque type cellulaire considéré.

Un modèle classique pour expliquer ce couplage est que le centrosome jouerait le rôle de lien entre des forces de traction générées par les microtubules du neurite de tête et la cage de microtubules péri-nucléaire (Rivas et Hatten 1990 ; Xie et al. 2003 ; Solecki et al. 2004 ; Tanaka et al. 2004 ; Tsai et Gleeson 2005). Les forces générées par le neurite de tête seraient transmises au centrosome qui tirerait le noyau vers l'avant. Ce modèle repose sur deux observations : i) la convergence du réseau de microtubules vers le centrosome (Tanaka et al. 2004) et ii) les déformations de la cage péri-nucléaire qui s'allonge et se contracte le long de l'axe de migration dans les neurones granulaires du cervelet en migration (Solecki et al. 2004).

Le couplage entre le noyau et le centrosome est régulé par des protéines localisées au niveau du centrosome et de la cage péri-nucléaire. Dans les neurones de cervelet ou de cortex, l'électroporation *in utero* de formes mutées de ces protéines régulatrices entraînent des défauts de nucléokinèse mais aussi des défauts de couplage noyau-centrosome avec une augmentation de la distance moyenne noyau-centrosome.

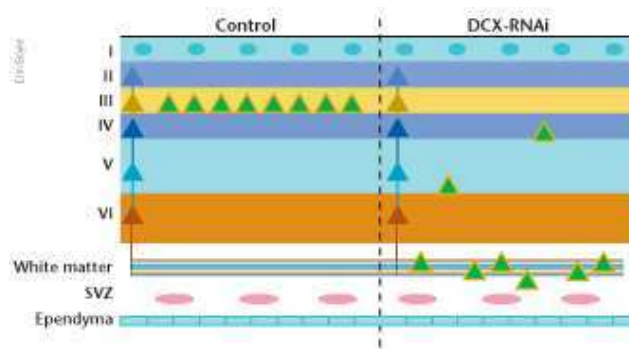
## **4.2 Protéines associées aux microtubules impliquées dans le couplage noyau-centrosome.**

### **4.2.1 Dcx**

L'expression de la protéine Dcx est observée dès le 11ème jour embryonnaire dans les neurones post-mitotiques. Dcx est une protéine qui s'associe aux microtubules et les stabilise dans son état non-phosphorylé (Francis et al. 1999 ; Gleeson et al. 1999). Dcx est enrichie aux extrémités des processus neuronaux et dans le soma au niveau de la cage perinucléaire et autour du centrosome (Francis et al. 1999). Elle est impliquée dans le trafic vésiculaire (Friocourt et al. 2001), la régulation de l'adhérence cellulaire, la stabilité des protéines (Kizhatil 2002; Friocourt et al. 2005), et les liens entre microtubules et actine (Tsukada et al. 2003, 2005). Les interactions entre Dcx et les microtubules sont contrôlées par la protéine kinase A (PKA) et les kinases de la famille MARK/PAR-1. Les processus de phosphorylation/déphosphorylation de Dcx contrôleraient sa localisation et son activité aux cônes de croissance des neurones en migration (Schaar et al. 2004).

Le cerveau des souris KO pour Dcx ne présente pas de défaut apparent concernant la migration radiale (Corbo et al. 2002). En revanche, les expériences d'interférence par ARN (RNAi) chez le rat du groupe de LoTurco ont phéno-copié le « double-cortex » des patients porteurs d'une mutation de la protéine doublecortine :

- 1) des neurones stoppent leur migration pour former une bande sous-corticale hétérotopique dans la zone intermédiaire puis la substance blanche et
- 2) des neurones migrent à des positions aberrantes dans un cortex bien structuré (voir Fig.71) (Bai et al. 2003).



**Fig.71 Diagramme schématique illustrant le phénotype de « double-cortex » obtenu par Bai et al. après inactivation de la protéine Dcx.**  
(Götz 2003)

L'électroporation *in utero* d'une forme mutée de la protéine Dcx induit un retard de migration des neurones granulaires du cervelet et un découplage noyau-centrosome avec une augmentation de la distance entre ces deux organites. En revanche, la surexpression de Dcx stimule *in-vitro* la migration des grains du cervelet et compense le couplage noyau-centrosome défectueux des neurones Dcx(-/-) (Tanaka et al. 2004a,b).

Les interneurones en migration tangentielle issus d'embryons KO pour Dcx présentent des anomalies de morphologie et de dynamique de migration, qui ne s'accompagnent cependant pas de retards de migration (Kappeler et al. 2006). Lorsque Dcx est inactivée par RNAi, un retard de la migration tangentielle des interneurones corticaux est alors observé, avec les mêmes anomalies morphologiques que les cellules mutantes (Friocourt et al. 2007). Les différences entre les effets du KO de Dcx et son inactivation par RNAi sont peut-être dues à une redondance fonctionnelle chez le mutant, car il existe une seconde protéine très proche de Dcx, la protéine Dclk (Doublecortin-like). L'inactivation de Dclk induit aussi un retard de migration des interneurones corticaux, mais sans anomalie de branchement (Friocourt et al. 2007).

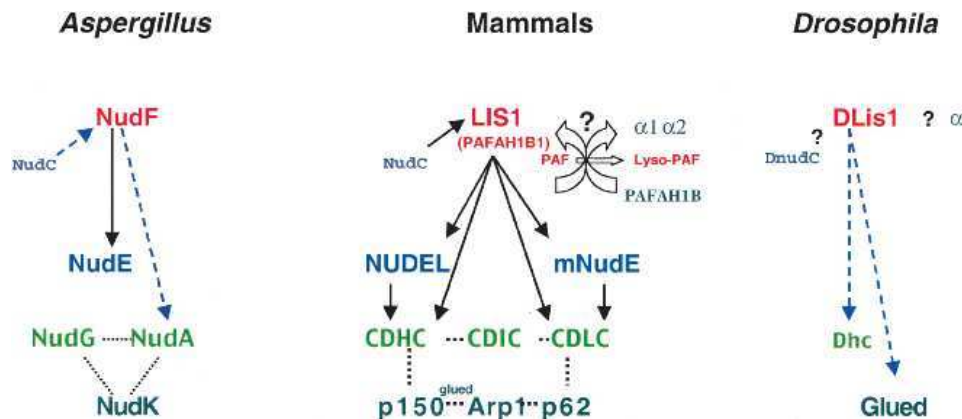
Enfin, la migration des neurones de la zone sous-ventriculaire dans le flux de migration rostral chez l'embryon et chez l'adulte est fortement inhibée dans les souris mutantes pour Dcx, avec des défauts morphologiques importants (Koizumi et al. 2006 ; Ocbina et al. 2006), ainsi que dans le flux de migration cortical latéral (lateral cortical stream ; Bai et al. 2008).

#### 4.2.2 Le complexe Lis1-Ndel1-dynéine

Lis1 est fortement exprimée dans la plaque corticale embryonnaire de l'homme et de la souris (Reiner et al. 1995). Sur la base de ce profil d'expression, Reiner proposa que les défauts de migration neuronale observés dans les cas de lissencéphalies de type I associées à la mutation de Lis1, sont causés par des défauts de migration neuronale. La même hypothèse fut formulée par la suite en 1998 par le groupe de Xiang sur la base d'études chez la levure (Morris et al. 1998).

Chez la levure, les mouvements des noyaux lors de la formation du mycélium repose sur le système microtubulaire et la dynéine. Les protéines de levure de la famille *nud* (nuclear distribution) ressemblent aux sous-unités  $\beta$  des protéines G hétérotrimériques. Elles sont ubiquitaires et exprimées chez l'homme, la souris, la drosophile et C.elegans. Ces protéines interagissent entre elles et participent avec le système dynéine-dynactine aux mouvements nucléaires dans le cytoplasme (Morris 2003). Lis1 est l'orthologue (42% d'homologie) de

nudF (nuclear distribution F ; Fig.72) dont la mutation entraîne des défauts de la nucléokinèse lors de la formation du mycélium chez la levure (Xiang et al. 1995 ; Winsahw-Boris et Gambello 2001). Ces défauts sont également provoqués par la mutation des protéines nudC et nudE, dont les orthologues chez les mammifères sont mNudC (pour nudC) et mNudE (ou Nde1) et NudEL (NudE-like ou Nde11 pour nudE). Chez la levure, les protéines nudC, nudF et nudE interagissent avec la dynéine, et chez la drosophile l'orthologue de Lis1 présente lui-aussi des interactions avec la dynéine et avec p150Glued, sous-unité de la dynactine (Lei et al. 2000).



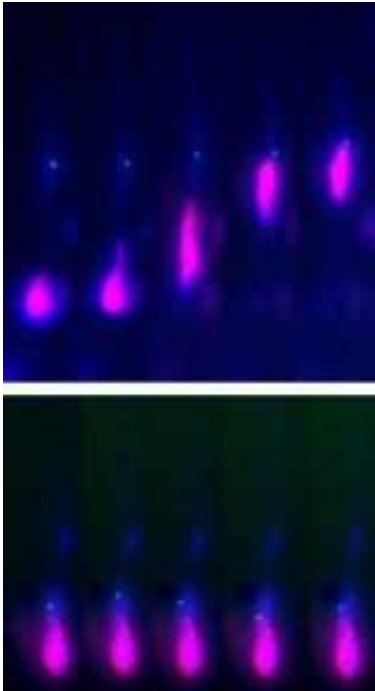
**Fig.72 Les protéines de la voie nud (nuclear distribution) chez la levure *Aspergillus Nidulans*, les mammifères et la drosophile.**

Les flèches pleines indiquent les interactions directes, les interactions génétiques sont représentées par les flèches brisées.  
(Winsahw-Boris et Gambello 2001)

Lis1 est une phospho-protéine associée aux microtubules et régulée pendant le développement. Elle est exprimée 15 à 30 fois plus dans les neurones que dans d'autres types cellulaires (Smith et al. 2000). Dans le cerveau embryonnaire de souris, Lis1 interagit avec mNudC, avec la dynéine et avec Nde1 et Nde11, protéines du centrosome et des cônes de croissance (Morris et al. 1998 ; Gupta et al. 2002). La déstabilisation des microtubules délocalise Lis1 du centrosome. Lis1 fait partie du complexe PAFAH (Platelet-Activating Factor AcetylHydrolase), une enzyme qui dégrade le facteur activé par les plaquettes (Hattori et al. 1994), connu pour inhiber la migration des grains du cervelet *in vitro* (Bix et Clark 1998). Lis1 est aussi trouvée dans un complexe avec deux autres protéines, la kinase Tat-associée des cellules T et une tyrosine-kinase de la rate. *In vitro* Lis1 est phosphorylée par la casein-kinase II (CKII ; Sapir et al. 1999). Lis1 augmente les événements de catastrophe des microtubules (Sapir et al. 1997) et module la fonction de la dynéine en stimulant son activité ATPasique (Faulkner et al. 2000 ; Liu et al. 2000 ; Smith et al. 2000), interaction favorisée par Nde11 (Mesngon et al. 2006).

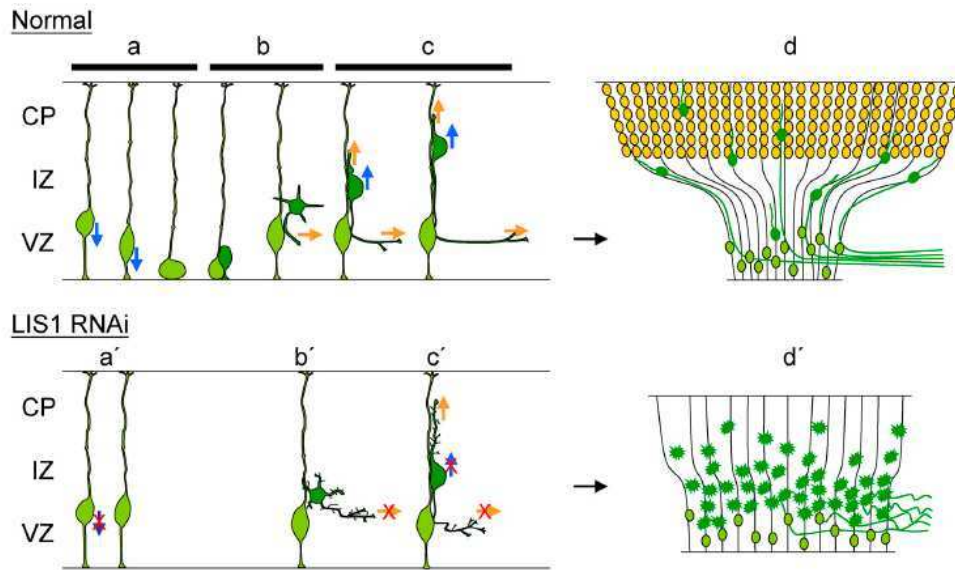
Le complexe Lis1-Nde11-dynéine associé aux microtubules contrôle la migration neuronale. En effet, des expériences *in vitro* et *in vivo* de perte de fonction par RNAi de la dynéine, de Nde11 ou de Lis1 démontrent que ce complexe contrôle la migration neuronale radiale, et le couplage entre le noyau et le centrosome (Fig.73-74 ; Hafezparast et al. 2003 ; Shu et al. 2004 ; Tsai et al. 2007 ; Bai et al. 2008). Les défauts de la migration radiale sont en effet associés à un défaut de couplage entre le noyau et le centrosome qui se traduit par une augmentation de la distance noyau-centrosome. Ces résultats sont retrouvés avec les cellules mutantes pour Lis1 ou transfectées avec des constructions inactives pour Nde11 (Tanaka et al. 2004 ; Toyo-

Oka et al. 2005). Dans les expériences par RNAi la distance noyau-centrosome est augmentée lorsque l'on touche à l'une des protéines du complexe (Tanaka et al. 2004).



**Fig.73 Séquences de migration d'un neurone cortical sauvage (A) ou inactivé pour Lis1 (B).**  
En vert le centrosome, en rouge le noyau.  
(Tsai et al. 2007)

On peut noter que le rôle de Ndel1 diffère de celui de Nde1. Les fonctions de Ndel1 et de Nde1 semblent cruciales pour la migration et la prolifération neuronale, respectivement. En effet, si la réduction de l'expression de Ndel1, dans un modèle génétique ou par RNAi, entraîne des défauts de migration neuronale, partiellement récupérés par la surexpression de Lis1 (Sasaki et al. 2005), les souris KO pour Nde1 sont microcéphaliques mais avec un cortex correctement laminé (Feng et Walsh 2004). Lis1, qui interagit avec Ndel1 et avec Nde1, contrôle à la fois la migration et la prolifération neuronales, en particulier les mouvements nucléaires interkinétiques. Ce rôle de Lis1 sur la prolifération neuronale est bien visible chez des mutants hypomorphes de Lis1, où il y a un amincissement du cortex (Gambello et al. 2003). La mutation hétérozygote de Lis1 se traduit par des défauts de la migration radiale et tangentielle, avec un phénotype tout de même moins sévère que celui présent dans les lissencéphalies humaines (Hirotsune et al. 1998 ; Cahana et al. 2001 ; Corbo et al. 2002 ; Gambello et al. 2003 ; McManus et al. 2004). Les neurones qui ne possèdent plus Lis1 s'accumulent dans la zone intermédiaire et présentent une morphologie multipolaire ; il semblerait donc que Lis1 soit nécessaire pour le passage du mode de migration multipolaire au mode de migration par locomotion (Tsai et al. 2005).



**Fig.74 Diagramme schématisant les effets de l'inhibition de Lis1 sur la prolifération, la migration et la morphogénèse neuronales.**  
(Tsai et al. 2005)

Le contrôle de la migration neuronale par Lis1 pourrait passer par des protéines autres que la dynéine et Ndel1, en particulier Dcx. Lis1 interagit avec Dcx (Caspi et al. 2000), et stimule son activité stabilisatrice. Lis1 est plus largement distribuée que Dcx, notamment dans les régions prolifératives (Meyer et al. 2002), ce qui pourrait expliquer les différences entre les phénotypes de leur mutant respectif. Très récemment, des expériences d'inactivation par ARN interférence combinées de Lis1 et Dcx ont démontré une interaction de ces deux protéines dans la morphologie et la migration des neurones du flux cortical latéral (Bai et al. 2008).

#### 4.2.3 DISC1

DISC1 est un composant du complexe dynéine/dynactine, qui stabilise ce complexe au centrosome et contrôle l'activité de la dynéine et l'organisation du réseau de microtubules. La protéine DISC1 interagit avec les protéines Ndel1 et Lis1 pour former un complexe trimoléculaire. La mutation de DISC1 chez l'homme est associée à des troubles neurologiques, dont des schizophrénies. Cette mutation joue le rôle de dominant-négatif chez l'animal et entraîne des défauts i) de localisation du complexe dynéine/dynactine au centrosome et ii) de l'organisation du réseau de microtubules.

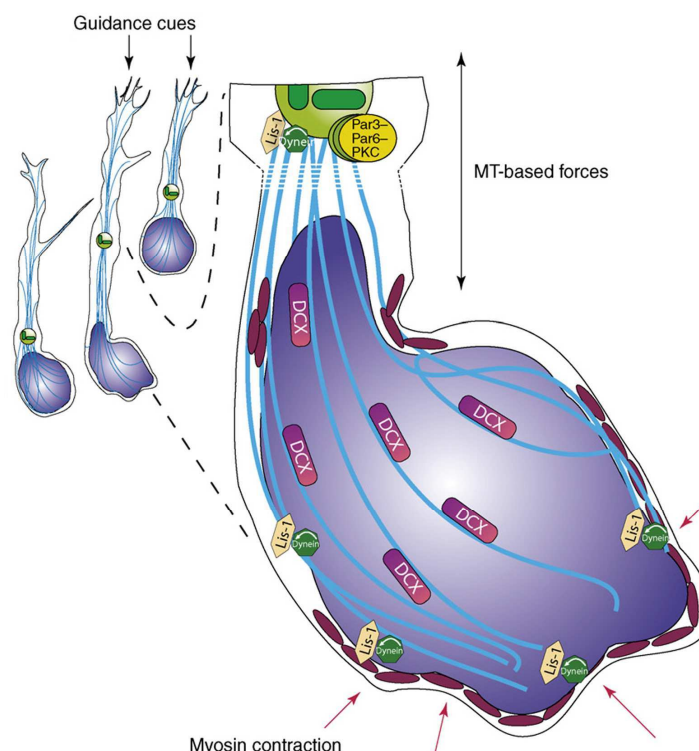
Au niveau cellulaire, l'inactivation *in vitro* de DISC1 par RNAi entraîne des défauts de pousse neuritique. *In vivo*, l'inactivation par RNAi de DISC1 ou l'expression forcée d'une forme mutée de DISC1 entraîne des défauts majeurs de la migration neuronale. Les neurones qui arrivent néanmoins à gagner la plaque corticale présentent une orientation, une polarité et un degré d'arborisation défectueux (Kamiya et al. 2005).

#### 4.2.4 FAK

FAK (Focal Adhesion-Kinase) est une tyrosine-kinase localisée au niveau des adhérences focales dans les cellules non-neuronales (Hanks et al. 1992 ; Schaller et al. 1992). Elle est nécessaire à la migration cellulaire non-neuronale (Parsons et al. 2000 ; Schaller et al. 2001). Chez les mammifères, FAK est fortement exprimée dans les neurones (Grant et al. 1995), et dans les neurones corticaux en migration, FAK est localisée sur la fourche de microtubules

devant le noyau et au niveau du centrosome. Elle est activée par Cdk5 (Cyclin-dépendant kinase 5), et l'expression *in vivo* par électroporation *in utero* de formes de FAK non-activables par Cdk5 entraîne des défauts de la migration neuronale (Xie et al. 2003), associés à une perte de la fourche de microtubules. De façon cohérente, l'expression d'un dominant-négatif de Cdk5 inhibe la migration des neurones corticaux, comme chez le mutant. Les neurones sont alors incapables de gagner la plaque corticale et s'accumulent dans la zone intermédiaire (ZI). Dans la zone intermédiaire profonde, ils adoptent une morphologie ronde et perdent leur morphologie multipolaire, et dans la ZI superficielle ils perdent leur morphologie bipolaire (Kawauchi et al. 2005), ce qui suggère que la kinase FAK et son activateur Cdk5 sont nécessaires à la migration neuronale.

Ainsi, certaines protéines associées aux microtubules contrôlent le couplage entre le noyau et le centrosome (voir figure ci-dessous).



**Fig.75 Modèle du couplage noyau-centrosome dans la nucléokinèse des neurones en migration.**  
(Higginbotham et Gleeson 2007)

Dans les neurones en migration, outre le rôle de protéines associées aux microtubules dans le couplage entre le noyau et le centrosome, la polarité et le positionnement du centrosome à l'avant du noyau sont des facteurs cruciaux pour les mouvements du noyau et pour permettre la migration neuronale.

## 5 Positionnement du centrosome dans les cellules non-neuronales

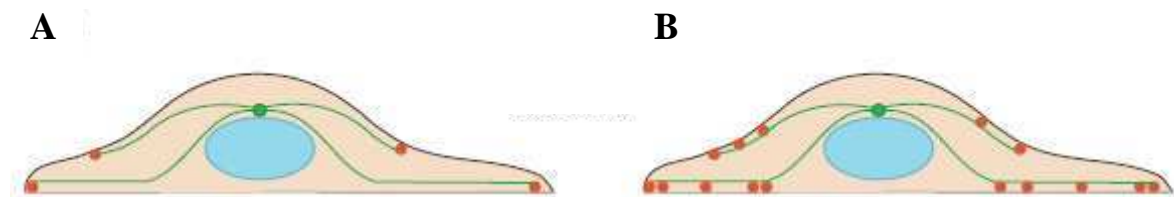
### 5.1 Positionnement du centrosome dans une cellule au repos

Dans une cellule au repos, le réseau de microtubules n'est pas polarisé. La position du centrosome est néanmoins contrôlée par les microtubules (Fig.76).



En effet, le centrosome se positionne au centre géométrique d'une cellule au repos, son centroïde, par des mécanismes dépendants des microtubules et de la dynéine en interaction avec le cortex cellulaire (Burakov et al. 2003 ; Vallee et Stehman 2005). Une question non encore résolue est de savoir si ces interactions se déroulent sur toute la longueur des microtubules ou simplement à leur extrémité. Il semblerait que la 1<sup>ère</sup> possibilité soit peut-être plus probable (Brodsky et al. 2007).

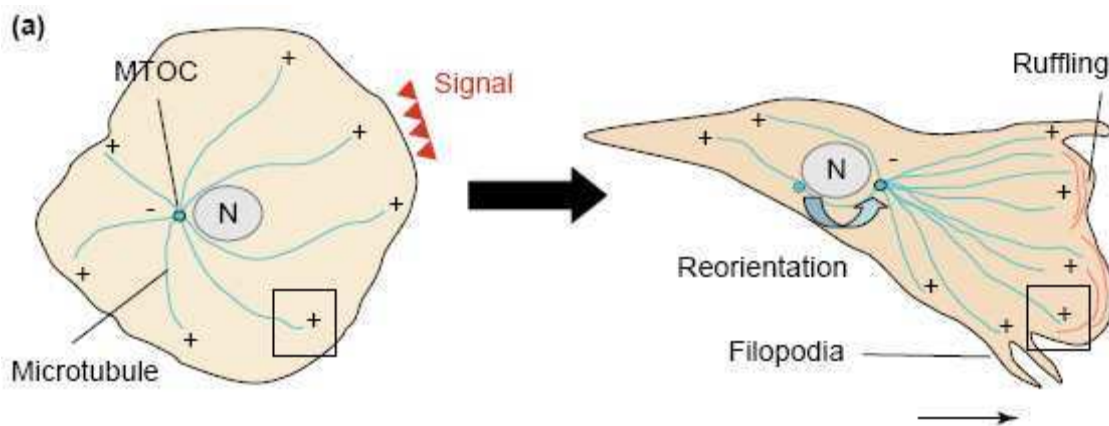
Le flux centripète d'actine assuré par la contraction du cytosquelette d'acto-myosine par l'intermédiaire de la voie Rho participe aussi au positionnement du centrosome: les microtubules sont tirés par les filaments d'actine auxquels ils sont attachés (Salmon et al. 2002 ; Burakov et al. 2003).



**Fig.76 Modèles du positionnement du centrosome dans une cellule au repos.**  
La dynéine corticale contacte A) l'extrémité des microtubules ou B) toute la longueur des microtubules. L'implication de l'acto-myosine n'apparaît pas. (Vallee et Stehman 2006)

## 5.2 Positionnement du centrosome dans une cellule en migration

Une migration persistante et dirigée nécessite la stabilisation de la polarité cellulaire, et ceci passe par la réorganisation du cytosquelette de microtubules contrôlée par les Rho-GTPases (Wittman et Waterman-Storer 2001). La polarisation initiale qui précède la migration d'une cellule s'accompagne le plus souvent (mais pas toujours) d'un repositionnement du centrosome face au front de migration (Fig.77).



**Fig.77 Le réseau polarisé de microtubules dans une cellule en migration.**  
(Watanabe et al. 2005)

Lors de la migration cellulaire, le repositionnement du centrosome est une étape précoce concomitante ou bien secondaire de l'apparition d'une polarité au niveau de la membrane plasmique. Le repositionnement du centrosome polarise le réseau de microtubules dans la direction de migration et la facilite. Le repositionnement du centrosome est inhibé par dépolymérisation des microtubules, ce qui montre que le repositionnement du centrosome

nécessite l'intégrité du système de microtubules et/ou de structures intracellulaires qui nécessitent l'intégrité des microtubules (Gotlieb et al 1983). Dans les neutrophiles en migration, la polarisation de la cellule en réponse à un gradient chimiotactique se traduit par l'apparition d'un pseudopode qui ne nécessite pas de repositionnement du centrosome (qui permettra sa stabilisation par la suite ; Euteneuer et Schliwa 1992 ; Ueda et al. 1997). En revanche, La formation d'un lamellipode au front de migration d'un fibroblaste nécessite le repositionnement du centrosome entre le front de migration et le noyau (Gundersen et Bulinski 1988).

Les données sur les processus de repositionnement du centrosome dans les cellules en migration proviennent pour la plupart d'expériences de cicatrisation avec des fibroblastes ou des astrocytes, dans lesquelles une rayure pratiquée dans le tapis cellulaire induit un repositionnement précoce du centrosome et de l'appareil de Golgi entre le noyau et le front de migration des cellules (Gotlieb et al. 1981 ; Kupfer et al. 1982 ; Hall 2005). L'étude de ce processus a démontré que le centrosome se repositionne après que les microtubules se soient ancrés et stabilisés au front de migration. Pour participer au processus de repositionnement du centrosome, certaines MAPs se concentrent aux extrémités (+) des microtubules (Schuyler et al. 2001 ; Galjart et Perez 2003), les Rho-GTPases contrôlent le recrutement et la stabilisation des microtubules au front de migration et le système dynéine-Lis1 tire les microtubules et de ce fait le centrosome dans la direction de migration.

Ce mécanisme est important pour faciliter la migration en dirigeant le transport des divers éléments cytoplasmiques vers le front de migration (Ma et Chisholm 2002), notamment délivrer du matériel membranaire depuis l'appareil de Golgi (Bergmann et al. 1983 ; Singer et Kupfer 1986 ; Prigozhina et Waterman-Storer 2004).

### **5.2.1 Rôle des Rho-GTPases dans la capture et la stabilisation des microtubules au front de migration**

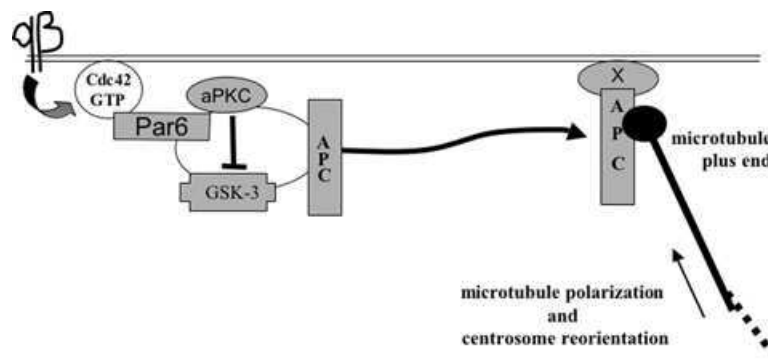
Les Rho-GTPases contrôlent la capture et l'ancrage des microtubules au front de migration, qui va permettre de stabiliser la polarité cellulaire et ainsi de permettre une migration dirigée persistante.

La polarisation de nombreux types cellulaires dépend de protéines conservées de la famille *Par* (pour *Partition defective* ; pour revue Suzuki et Ohno 2006). Celles-ci contrôlent la première division asymétrique chez le nématode *C.elegans*. Le complexe Par6/Par3/PKC $\zeta$  régule la polarisation des cellules épithéliales et neuronales chez la drosophile et chez les mammifères. Dans un astrocyte en migration, la polarisation s'accompagne au niveau du front de migration de l'activation des intégrines (Etienne-Maneville et Hall 2001) et du recrutement de la protéine Scrib (impliquée dans la polarité apico-basale chez la drosophile ; Albertson et Doe 2003) et de  $\beta$ PIX (Osmani et al. 2006).

Ces événements induisent le recrutement et l'activation de Cdc42 au front de migration, qui va déclencher une cascade de signalisation débouchant sur le recrutement et la stabilisation des microtubules (Fig.78).

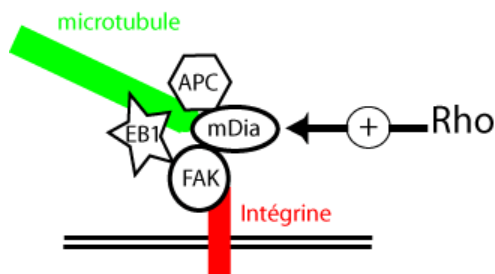
Pour cela, Cdc42 stimule la voie Par6/PKC $\zeta$  (Joberty et al. 2000 ; Etienne-Maneville et Hall 2001). Ce complexe inactive la GSK3 $\beta$ -kinase et permet l'association des protéines APC (Adenomatous Polyposis Coli) et Dlg1 avec l'extrémité (+) des microtubules au front de migration (Etienne-Maneville et Hall 2003 ; Etienne-Maneville et al. 2005 ; Osmani et al. 2006). La protéine APC est une protéine qui connecte les cytosquelettes d'actine et de microtubules et stabilise l'extrémité de ces derniers (Watanabe et al. 2004 ; Reilein et Nelson

2005). Ajoutons que  $\beta$ PIX n'est en revanche pas impliqué dans le positionnement du centrosome dans des fibroblastes en migration (Cau et Hall 2005).



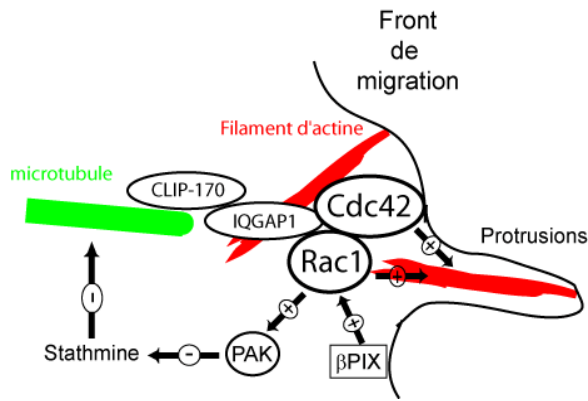
**Fig.78** Schéma de la voie de signalisation induite par l'activation de Cdc42 au front de migration d'astrocytes en migration (l'implication de Scrib n'est pas illustrée) (Hall 2005)

L'activation des intégrines au front de migration entraîne aussi la capture et la stabilisation des microtubules sous la dépendance de la voie Rho (Fig.79). En effet, au niveau des intégrines activées, la kinase FAK facilite le recrutement par la Rho-GTPase RhoA des protéines mDia, EB1 et APC au niveau des échafaudages protéiques formés sur les intégrines (Wen et al. 2004 ; Palazzo et al. 2004). APC et EB1 capturent les extrémités (+) des microtubules et forment à ce niveau un complexe stabilisateur (Mimoru-Kiyosue et al. 2000).



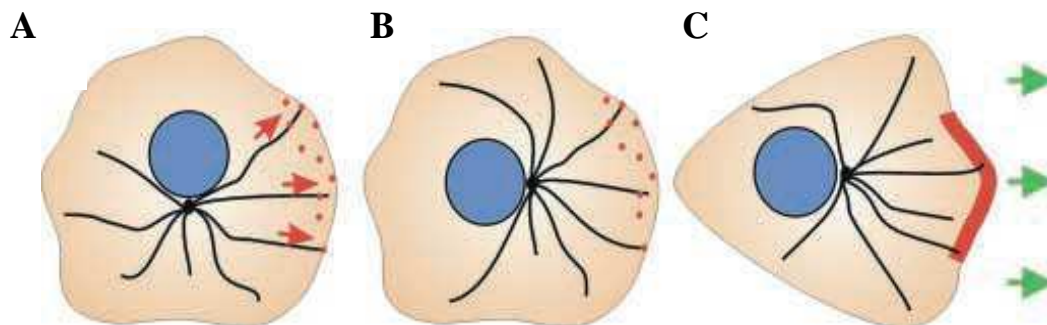
**Fig.79** Stabilisation des microtubules par la voie Rho.

En outre, IQGAP1 participe aussi au recrutement et à la stabilisation des microtubules au front de migration (Fig.80). IQGAP1 est un important régulateur des microtubules et de l'actine (Briggs et Sacks 2003) qui, grâce à ses nombreuses interactions protéiques et fonctions, stimule la motilité de nombreux types cellulaires (Watanabe et al. 2004 ; Kholmanskikh et al. 2006). Cdc42 et Rac1 permettent à IQGAP1 de capturer les extrémités des microtubules en croissance en se liant à CLIP-170 (Cytoplasmic-linker 170) (Fukata et al. 2002). La polarisation induit en outre au front de migration une localisation de  $\beta$ Pix-activé qui permet l'activation de Rac1. Cette activation de Rac1 permet l'élongation des microtubules, grâce à l'inactivation par PAK de la stathmine, protéine qui déstabilise les microtubules (Daub et al. 2001 ; Kuntziger et al. 2001).



**Fig.80 Recrutement et stabilisation des microtubules au front de migration par IQGAP1.**

### 5.2.2 Rôle de la dynéine et de Lis1 dans la capture et l'ancrage des microtubules au cortex cellulaire du front de migration



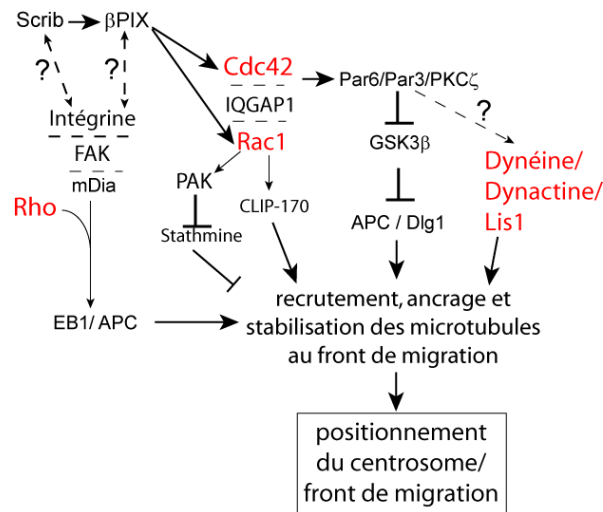
**Fig.81 Rôle de la dynéine cytoplasmique et de ses protéines associées durant la migration.**

a-b la dynéine et ses protéines associées tirent sur les microtubules et/ou ancrent les microtubules au front de migration contre les forces rétrogrades.

c- durant la migration, la dynéine est enrichie dans les protrusions du lamellipode où elle régule les mouvements de la cellule vers l'avant.

(Dujardin et al. 2003)

La dynéine, la dynactine qui la régule et Lis1 participent aussi au positionnement du centrosome dans les cellules en migration, par un processus comparable à celui de cellules au repos. La polarisation de la cellule induit une localisation du complexe dynéine-dynactine-Lis1 au front de migration (Fig.81). L'inhibition de la dynéine, de la dynactine ou de Lis1 inhibe le repositionnement du centrosome et la migration des fibroblastes (Dujardin et al. 2003). En revanche, la stabilisation ou l'organisation des microtubules ne sont pas affectées dans ces expériences, ce qui suggère que le système dynéine-dynactine-Lis1 ne contrôle pas les processus dépendants des Rho-GTPases d'ancrage et de stabilisation des microtubules (Etienne-Manneville et Hall 2001 ; Palazzo et al. 2001). *A contrario*, il est fort probable que la voie Cdc42- Par6-PKC $\zeta$  contrôle le système dynéine-dynactine-Lis1 pour aider au recrutement des microtubules au front de migration. En effet, l'inhibition de la voie Cdc42- Par6-PKC $\zeta$  s'accompagne d'une inhibition du repositionnement du centrosome selon un phénotype identique à celui induit par l'inhibition du système microtubules/dynéine/dynactine (Gomes et al. 05).



**Fig. 82 Schéma1 récapitulatif des acteurs qui contrôlent le positionnement du centrosome dans une cellule en migration.**

## 6 Positionnement du centrosome à l'avant du noyau dans les neurones en migration

Dans les neurones granulaires en migration, le complexe mPar6 $\alpha$ -PKC $\zeta$  et la dynéine sont localisés au centrosome. *In vitro*, la surexpression de mPar6 $\alpha$  ou de p150Glued dans ces neurones affecte l'organisation des microtubules, en particulier celle de la cage peri-nucléaire. La protéine PKC $\zeta$  est alors délocalisée du centrosome et les neurones sont incapables de migrer. *In vivo*, l'inhibition de mPar6 $\alpha$  entraîne une perte des mouvements centrosomiaux et cette inhibition (ainsi que celle de la dynactine) entraîne une inhibition de la migration des neurones du cervelet (Solecki et al. 2004). En outre, le repositionnement du centrosome dans les neurones de la zone sous-ventriculaire en migration nécessite l'activité de la PKC $\zeta$  et de la kinase GSK3 $\beta$  (Higginbotham et al. 2006), ce qui suggère que le complexe mPar6 $\alpha$ -PKC $\zeta$  contrôle l'activité de la kinase GSK3 $\beta$  pour repositionner le centrosome dans les neurones en migration, selon un mode similaire à celui que l'on trouve dans les astrocytes. Mais mPar6 $\alpha$  contrôle également la polarité des neurones en différenciation et la spécification de l'axone (Shi et al. 2003). Or le positionnement du centrosome détermine le site d'émergence de l'axone durant la différenciation des neurones granulaires du cervelet (Zmuda et Rivas 1998).

Les protéines de la polarité contrôlent donc probablement le positionnement du centrosome dans les neurones en migration et lors de leur différenciation.

Cette hypothèse est appuyée par une étude récente qui a ciblé LKB1, homologue de Par4 chez *C.elegans*. L'inactivation de LKB1 dans le cerveau embryonnaire inhibe la migration neuronale, et induit des défauts de couplage entre le noyau et le centrosome (augmentation de la distance moyenne entre le noyau et le centrosome). Ces résultats sont donc cohérents avec le rôle des protéines de polarité de la famille *Par* dans le contrôle du positionnement du centrosome dans les neurones en migration. L'inactivation de LKB1 entraîne de surcroît une inversion de la polarité des neurones différenciés associée à un positionnement du centrosome défectueux. De plus, LKB1 spécifie *in vitro* l'axone et les dendrites des neurones en culture (Asada et al. 2007).

Ainsi, ces études suggèrent fortement que les protéines de la polarité de la famille *Par* et la voie Par6/PKC $\zeta$  contrôlent le positionnement du centrosome dans les neurones en migration,

qui semble nécessaire au processus migratoire *per se*, et contrôlent le positionnement du centrosome dans les neurones en différenciation.

## 7 La remise en cause actuelle du modèle classique de la nucléokinèse

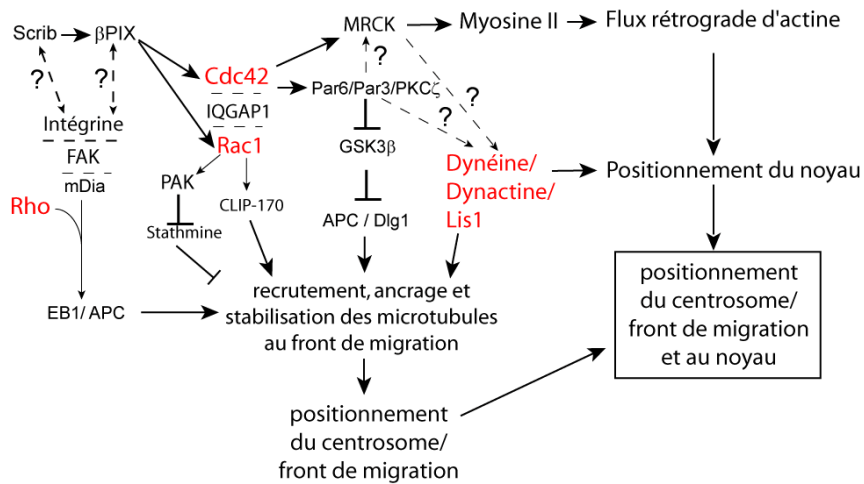
On peut s'interroger aujourd'hui sur la validité du modèle de la nucléokinèse neuronale dans lequel le centrosome tire le noyau par l'intermédiaire des microtubules. En effet, des données anciennes de microscopie électronique montrent que le centrosome peut se situer derrière le noyau dans des neurones en migration (Rakic 1972 ; Gregory et al. 1988), ce qui suggère que le noyau puisse migrer en avance sur le centrosome. Cette possibilité fut récemment suggérée par le groupe de Gleeson (Higginbotham et al. 2006), qui ont observé des translocations nucléaires sans positionnement du centrosome à l'avant du noyau. Pour aller dans ce sens, nos données (Bellion et al. 2005) et celles de Baird et al. (2004) ont suggéré que les microtubules ne sont pas fortement ancrés au centrosome, ce qui ne remet pas en cause le couplage entre le noyau et le centrosome mais va à l'encontre de l'idée d'une traction du noyau par le centrosome par l'intermédiaire des microtubules. Le positionnement du centrosome à l'avant du noyau ne serait peut-être pas aussi crucial qu'on le pensait. Plusieurs arguments vont dans ce sens, et une étude très récente du groupe de Mineko Kengaku montre qu'*in vivo* le noyau précède le centrosome lors de la migration de grains du cervelet, avec des mouvements nucléaires plus rapides que ceux du centrosome (ce qui n'est en revanche pas observé *in vitro* dans cette étude) (Umeshima et al. 2007).

Or le fait que le noyau puisse transloquer dans une cellule en migration sans que le centrosome ne soit positionné entre celui-ci et le front de migration n'est pas incohérent avec certaines données.

En effet, premièrement, dans des cellules au repos qui ne possèdent pas de centrosome (karyoplastes), le noyau se positionne par l'intermédiaire des microtubules et de la dynéine, par un mécanisme de glissement du noyau le long de microtubules ancrés au cortex cellulaire. Dans les karyoplastes au repos, le noyau se déplacerait ainsi selon un mode 'actif', si on l'oppose à un mode plus 'passif' dans les cellules qui contiennent un centrosome et où les mouvements du noyau sont couplés à ceux du centrosome. (Reinsch et Gönczy 1998).

Deuxièmement, dans les astrocytes en migration, l'activation de Cdc42 induit un repositionnement du noyau indépendant du centrosome par contraction du système d'acto-myosine. Le noyau est repositionné dans la direction opposée au front de migration. Pour cela, Cdc42 active le système d'acto-myosine par l'intermédiaire de la MRCK, qui induit un flux rétrograde d'actine qui déplace le noyau dans la direction opposée au front de migration (Fig.83) (Gomes et al. 2005). Ainsi récemment un nouveau concept est apparu, dans lequel il n'y plus seulement un pôle-front de migration et un repositionnement du centrosome par rapport à celui-ci, mais dans lequel il y a aussi un pôle arrière vers lequel le noyau est repositionné, et qui influence le comportement du centrosome. Ainsi, l'apparition concomitante des deux pôles induirait une séquence d'événements qui repositionneraient le noyau d'une part, puis le centrosome au nouveau centroïde de la cellule d'autre part (Gomes et al. 2005).





**Fig. 83 Schéma2 récapitulatif des acteurs qui contrôlent le positionnement du centrosome dans une cellule en migration.**

Le fait que le noyau des neurones en migration puisse *transloquer* sans que le centrosome ne soit positionné devant lui semble donc cohérent avec le fait que le noyau puisse *se positionner* sans que le centrosome ne soit au préalable positionné correctement dans des cellules non-neuronales au repos ou en migration. Ajoutons cependant que les processus de translocation nucléaire et de positionnement du noyau sont distincts et ne nécessitent probablement pas les mêmes acteurs et les mêmes mécanismes de contrôle.

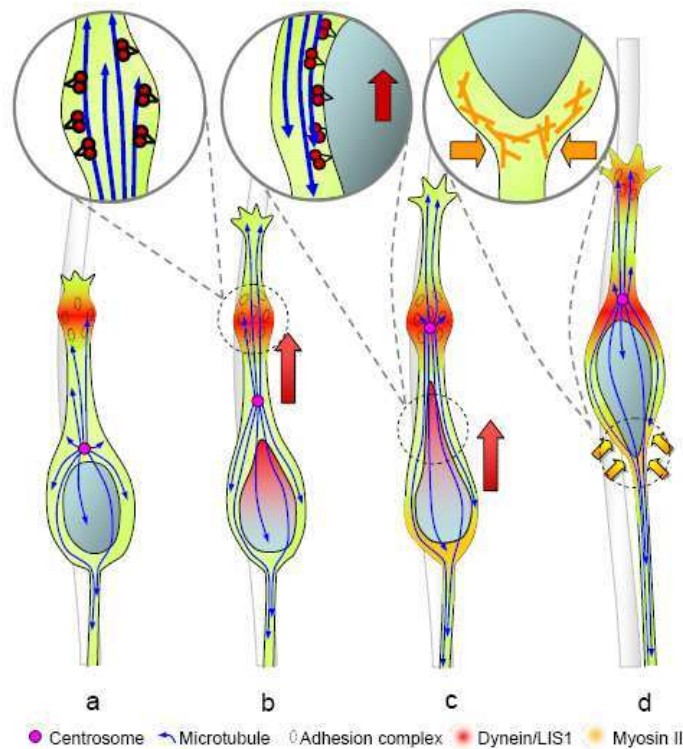
## 8 Le rôle de la dynéine et de Lis1 dans les mouvements du centrosome dans les neurones en migration

Aujourd'hui, l'idée qui se dégage des différentes études que nous avons abordées qui discutent les mouvements du centrosome dans les neurones en migration, est que celui-ci serait tiré vers l'avant par l'intermédiaire des microtubules du neurite de tête reliés au centrosome. En effet, *in vitro*, les mouvements du centrosome sont corrélés à un faisceau de microtubules qui émane du centrosome et qui chemine dans le processus avant (Umeshima et al. 2007), et les études morphologiques de l'organisation des microtubules dans les neurones en migration vont dans ce sens (Gregory et al. 1988 ; Schaar et McConnell 2005). La dynéine et Lis1 sont considérés comme les acteurs privilégiés des mouvements antérogrades du centrosome, car ces protéines se localisent au centrosome, avec une localisation plus large de la dynéine à tout le renflement avant qui contient le centrosome (Tsai et al. 2007). De plus, l'inactivation *in vivo* de ces deux protéines dans les neurones corticaux en migration inhibe les mouvements antérogrades du centrosome dans le neurite de tête (Tsai et al. 2007). Le rôle de Lis1 est plus subtil à ce niveau-là, car son inactivation dans des neurones granulaires en migration ne bloque pas les mouvements centrosomiaux (Umeshima et al. 2007). La différence pourrait provenir du fait que dans le 1<sup>er</sup> cas, le centrosome se déplace en avance sur le noyau, et dans le 2<sup>ème</sup> cas, se déplace en retard sur celui-ci.

Il est cependant suggéré que les mécanismes mis-en-jeu dans les mouvements du centrosome vers l'avant dans les neurones en migration sont similaires à ceux décrits au niveau du front de migration des fibroblastes, avec des microtubules qui seraient tirés vers l'avant par la dynéine (Dujardin et al. 2003).

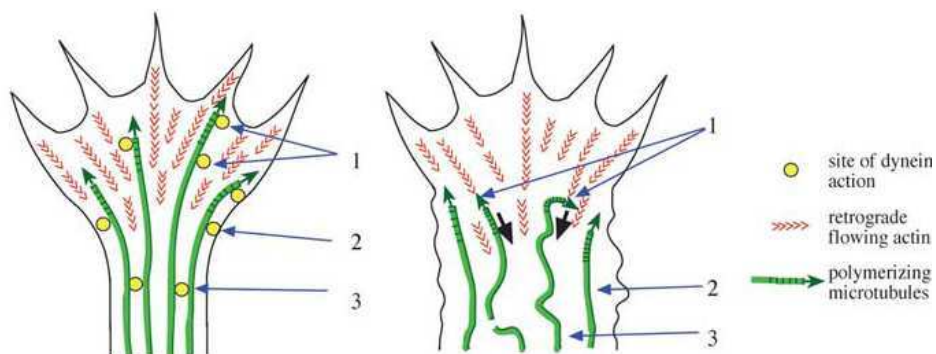
Il y aurait alors deux possibilités :

- 1) Selon Gleeson (Tsai et al. 2007), le renflement se formerait dans le processus de tête au niveau de sites d'adhérence avec une fibre de glie radiaire (ce qui est cohérent avec les travaux d'Elias et al. 2007 (Fig.84a). La dynéine serait recrutée au renflement et tirerait sur les microtubules pour faire avancer le centrosome et le réseau de microtubules (Fig.84b). Les microtubules à l'arrière du centrosome et la dynéine sur la surface nucléaire aideraient à tirer le noyau vers l'avant (Fig.84c), et la contraction de la myosine II à l'arrière du soma achèverait de transloquer le noyau vers l'avant (Fig.84d).



**Fig.84 Schéma des mécanismes de migration des neurones d'après Tsai et al. 2007.**

- 2) Une autre possibilité serait que le centrosome soit tiré par un mécanisme similaire à celui décrit par Gleeson, mais au niveau des cônes de croissance, qui sont aussi riches en dynéine (donnée personnelle). Une étude très récente montre que la dynéine et Lis1 sont nécessaires à l'organisation et à l'avancée des microtubules dans les cônes de croissance (Fig.85 ; Grabham et al. 2007).



**Fig.85 Ancrage des microtubules dans un cône de croissance dépendant de la dynéine.**  
(Grabham et al. 2007)

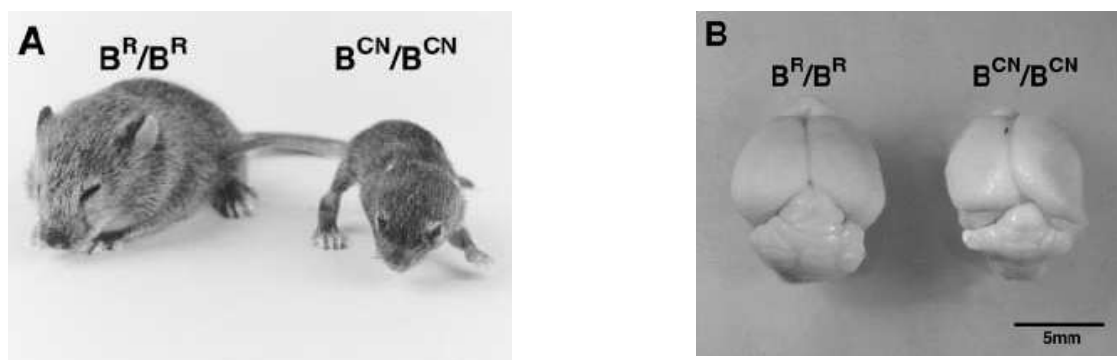
Pour aller dans le sens de la 2<sup>ème</sup> hypothèse, dans des neurones inhibiteurs en culture sur un tapis de cellules gliales, le centrosome et l'appareil de Golgi viennent se positionner à la base du neurite en extension, après que celui-ci ait commencé à pousser. Selon l'auteur, le centrosome et l'appareil de Golgi qui lui est associé sont tirés par le neurite en extension par l'intermédiaire des microtubules (Hayashi et al. 2003).

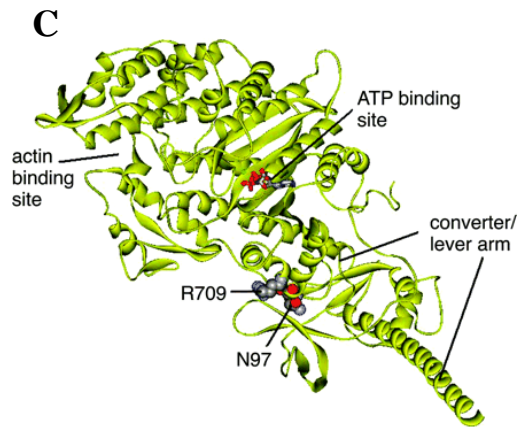
Dans notre étude morphologique des interneurons corticaux en migration, nous avons pu observer une organisation disymétrique des microtubules autour du centrosome : les microtubules centrosomaux dans les interneurons corticaux en migration sont en proportion orientés préférentiellement vers les cônes de croissance (Baudoin et al., *manuscrit soumis pour publication*). Ainsi, les deux hypothèses précédentes seraient en accord avec nos résultats, et la question du mécanisme de migration antérograde du centrosome n'est pas encore résolue.

## 9 Rôle de l'acto-myosine dans la migration neuronale

La déstabilisation pharmacologique des filaments d'actine de neurones cérébelleux en migration sur la glie radiaire bloque leur migration, ce qui démontre l'implication de l'actine dans la motilité des neurones du cervelet (Rivas et Hatten 1995). Cela serait aussi le cas dans les neurones de la zone sous-ventriculaire, où les cellules semblent figées et perdent leurs filopodes après le même traitement (Higginbotham et al. 2006). Ainsi, il semble que l'intégrité du cytosquelette d'actine soit nécessaire à la migration neuronale.

Le rôle de la contractilité du système d'acto-myosine dans la migration neuronale est recherché depuis quelques années seulement. En effet, l'implication du système d'acto-myosine ne fut proposée qu'en 2003 (Wylie et Chantler 2003). Les études ont d'abord débuté par des approches d'invalidation génétique. Mais l'étude du rôle de l'isoforme IIB de la myosine non-musculaire (NMHC II-B) dans la migration neuronale chez le KO NMHC II-B ne fut pas possible du fait de la léthalité précoce des embryons. Une lignée de souris hypomorphes pour la NMHC II-B, la lignée R709C, a alors été réalisée par le groupe d'Adelstein (Fig.86c ; Ma et al. 2004). Chez ces animaux, le gène de la MHC II-B présente une mutation ponctuelle qui code pour une protéine hypomorphe. Cette mutation entraîne une léthalité post-natale importante (>95% à P15), des retards de croissance à partir de P3, une hydrocéphalie progressive, un cortex malformé, un cervelet sous-développé et une ataxie post-natale précoce (Fig86a,b). Au niveau moléculaire, la mutation R709C entraîne une augmentation de la durée de liaison de la myosine aux filaments d'actine, qui se traduit par une diminution de 70% de l'efficacité de contraction du système actine-NMHCII-B.





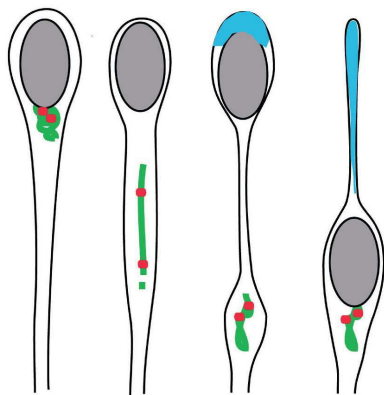
**Fig.86**

- A- Souris sauvage (Br/Br) et souris homozygote pour la mutation R709C (Bcn/Bcn), à P15**
- B- Vue d'un cerveau (Br/Br) et d'un cerveau mutant (Bcn/Bcn)**
- C- Localisation de la mutation dans la structure atomique du domaine moteur de la myosine.**

(Ma et al. 2004 ; Kim et al. 2005)

Chez les souris hypomorphes pour la NMHC-IIB, on peut observer *in vivo* et *in vitro* des défauts importants de la migration neuronale (neurones faciaux, grains du cervelet et neurones précérébelleux). Ainsi le rôle de la myosine IIB dans la migration neuronale fut démontré (Ma et al. 2004).

En 2005, nous avons démontré l'implication du système d'acto-myosine dans la migration des interneurons corticaux (Fig.87). La blebbistatine est un inhibiteur pharmacologique des isoformes IIa et IIB de la myosine qui bloque la myosine II dans une conformation détachée des filaments d'actine. *In vitro*, les applications de blebbistatine sur des interneurons corticaux, des neurones de la zone sous-ventriculaire ou des neurones corticaux en migration entraîne un blocage de leurs translocations nucléaires (Bellion et al. 2005 ; Schaar et McConnell 2005 ; Tsai et al. 2007).



**Fig.87 Activation de la myosine II à l'arrière du soma lors de la translocation nucléaire.**

Par la suite, nous avons pu (avec Nathalie Néric, étudiante M2) confirmer ces résultats par l'étude de la migration d'interneurones corticaux hypomorphes pour la NMHCII-B.

Ensuite la NMHC-IIB a été inactivée *in vivo* par RNAi par le groupe de Vallee et a entraîné un blocage des translocations nucléaires. Le noyau occupe alors une position plus rostrale dans le soma qu'en condition contrôle. De plus, le branchement est légèrement augmenté dans les cellules inactivées pour la myosine IIB (Tsai et al. 2007).

Ces études démontrent que la myosine II, et en particulier l'isoforme IIB, joue un rôle majeur dans la migration neuronale. La myosine IIB est nécessaire aux mouvements nucléaires et contrôlerait aussi la morphologie des neurones en migration.

En outre, le système d'acto-myosine contrôle probablement le couplage entre le noyau et le centrosome. Premièrement, l'intégrité du cytosquelette d'actine semble nécessaire aux mouvements du centrosome : la déstabilisation pharmacologique de l'actine dans les neurones

de la zone sous-ventriculaire bloque les mouvements du centrosome (Higginbotham et al. 2006). Deuxièmement, l'activité de la myosine II, en particulier l'isoforme IIB, contrôle probablement le couplage entre le noyau et le centrosome, comme illustré dans les expériences d'inactivation génétique de la myosine IIB ou pharmacologique de la myosine II, où les défauts de migration sont associés à un défaut du couplage noyau-centrosome associé à une augmentation de la distance moyenne noyau-centrosome (Tsai et al. 2007 ; Baudoin et al. *en préparation*). Le système d'acto-myosine pourrait participer aux mouvements du centrosome par l'intermédiaire de microtubules ancrés au niveau par les filaments d'actine des cônes de croissance, dont la dynamique dépend de la contractilité du système d'acto-myosine.

## **10 Rôle de la signalisation dans le contrôle des cytosquelettes de microtubules et d'acto-myosine dans la migration neuronale**

### **10.2 Voies de signalisation qui contrôlent les microtubules**

#### **10.1.1 CDK5**

La Sérine/Thréonine kinase Cdk5 fait partie de la famille des kinases dépendantes des cyclines (CDKs), mais son expression n'est pas forte durant la division cellulaire. L'activité de Cdk5 est déclenchée par deux sous-unités régulatrices, p35 et p39, dont les expressions sont spécifiques du tissu nerveux (Lew et al. 1994 ; Tang et al. 1995). L'activité de Cdk5 débute avec la fin de la neurogenèse et le commencement de la différenciation neuronale (Tsai et al. 1993). Cdk5 interagit avec les microtubules : Cdk5 phosphoryle la protéine Tau (Kobayashi et al. 1993 ; Paudel et al. 1993), Ndel1 (Niethammer et al. 2000), Dcx (Tanaka et al. 2004), MAP1B (Gonzalez-Billault et al. 2005) et FAK (Xie et al. 2003). Cdk5 interagit aussi avec l'actine : le complexe p35/Cdk5 inhibe l'activité de Pak1 et ainsi la polymérisation des filaments d'actine (Nikolic et al. 1998).

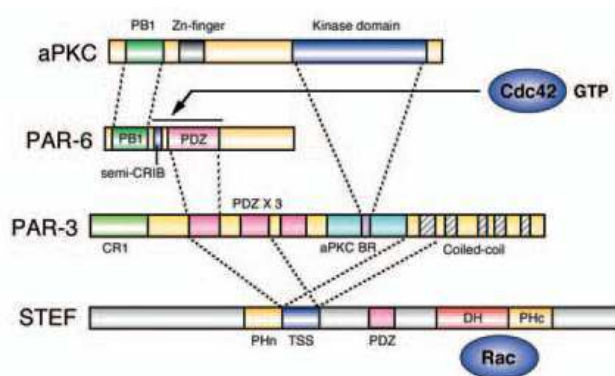
Les souris mutantes pour Cdk5 présentent une forte létalité péri-natale avec des défauts de lamination dans le cortex, le bulbe olfactif et le cervelet (Ohshima et al. 1996 ; Ohshima et al. 1999), causés par des défauts de la migration neuronale (Gilmore et al. 1998 ; Gilmore et Herrup 2001). Cet effet est retrouvé par expression d'un dominant-négatif de Cdk5, et les neurones sont alors incapables de gagner la plaque corticale et s'accumulent dans la zone intermédiaire, où ils adoptent une morphologie ronde et perdent leur morphologie multipolaire. Dans la ZI superficielle ils perdent leur morphologie bipolaire (Kawauchi et al. 2005).

Enfin, un défaut de p35 entraîne de façon cohérente un défaut de la migration neuronale, avec une inversion de la plaque corticale (Gupta et al. 2003 ; Hammond et al. 2004).

#### **10.1.2 STEF/Tiam1- Rac1- JNK**

Tiam1 et STEF (Tiam1like exchange factor aussi appelée Tiam2) sont des GEFs spécifiques de Rac, capables d'induire *in vitro* la formation de neurites dans des cellules de neuroblastome (Leeuwen et al. 1997 ; Matsuo et al. 2003). Rac1 et le complexe Tiam1/STEF sont nécessaires à la migration neuronale. En effet, l'expression de dominant-négatifs de STEF/Tiam1 ou de Rac1 empêche les neurones de migrer dans les couches superficielles de la plaque corticale. L'inactivation conditionnelle de Rac1 entraîne également des défauts de la migration radiale, un peu moindre que ceux obtenus avec la transfection d'un dominant-négatif (Chen et al. 2007).

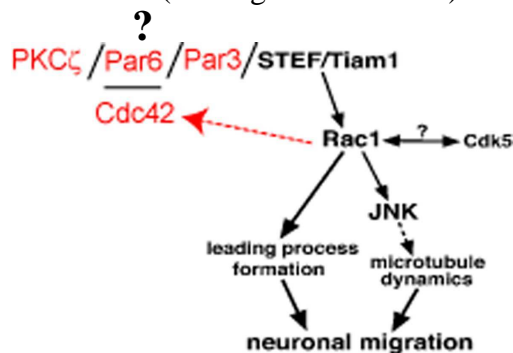
Dans des kératynocytes Tiam1 interagit avec le complexe de polarité Par3/Par6/PKC $\zeta$  pour contrôler la polarité apico-basale. Lorsque les cellules sont jointives, l'activation de Rac1 par Tiam1 active le complexe de polarité Par3/Par6/PKC $\zeta$  et permet la formation de jonctions serrées. Dans des kératynocytes en migration, Tiam1 et les protéines Par3 et PKC $\zeta$  localisent au front de migration. Des kératynocytes mutants pour Tiam1 sont incapables de migrer de façon dirigée. Ainsi, Tiam1 contrôlerait la polarité et la direction de migration des kératynocytes, et non leur motilité. Or des kératynocytes inactivés pour Par3 phéno-copient le comportement migratoire des kératynocytes KO pour Tiam1. La voie de signalisation Tiam1/protéinesPar semble donc contrôler la polarisation des kératynocytes en migration (Pegtel et al. « The Tiam1-Par polarity complex controls directionality of migrating keratynocytes », Communication au 6ème congrès 'Cell migration in development and Disease', Paris, 2006).



**Fig.88 Interactions protéiques entre STEF, PAR3, PAR6, PKC $\zeta$  et Cdc42.**  
Tiré de Nishimura et al. 2005.

Dans les neurones en différenciation, la voie Cdc42–Par6–Par3–STEF/Tiam1–Rac1 contrôle l'élongation neuritique (Fig.88 ; Nishimura et al. 2005). D'autre part, le complexe Par6–PKC $\zeta$  contrôle la migration des neurones granulaires (Solecki et al. 2004). En outre, le comportement migratoire des kératynocytes KO pour Tiam1 et le comportement multipolaire des interneurons corticaux traités avec de fortes doses de nocodazole sont similaires (Pegtel et al. 2006 ; Baudoin et al. 2007).

Ainsi, il est possible que le contrôle de la migration neuronale, qui nécessite la stabilisation du réseau de microtubules et la polarisation des neurones, passe par une voie Cdc42–Par6–Par3–STEF/Tiam1–Rac1–JNK–microtubules (voir figure ci-dessous).



**Fig.89 Voie de signalisation hypothétique passant par STEF/Tiam1.**  
(Adapté de Kawauchi et al. 2003)



## 10.2 Voies de signalisation qui contrôlent l'actine

### 10.2.1 Pak3

La protéine PAK3 est impliquée dans des formes de retard mental non-syndromique (Allen et al. 1998). L'ARN messager de PAK3 est fortement exprimé dans les interneurons corticaux qui ont fini de migrer et qui se différencient dans le cortex. Il est en revanche quasi-absent des interneurons avant et au début de leur migration, ce qui suggère que PAK3 contrôle la migration des interneurons corticaux.

Chez les souris mutantes pour *Dlx1/2* (Anderson et al. 1997), les interneurons qui s'accumulent dans le télencéphale basal expriment fortement PAK3. Les défauts de migration des interneurons corticaux issus de souris KO pour *Dlx1/2* sont associés à une augmentation de la longueur des neurites de ces cellules, récupérée par diminution de l'expression de PAK3. D'autre part les diminutions de l'expression de PAK3 entraînent une légère récupération des défauts de migration neuronale du mutant *Dlx1/2* (Cobos et al. 2007).

Ainsi, les gènes *Dlx1/2* contrôleraient PAK3 négativement pour permettre le comportement migratoire des interneurons corticaux. Le contrôle par *Dlx1/2* de l'expression de PAK3 s'étend probablement à d'autres protéines qui contrôlent le cytosquelette (Guillemot et al. 2007).

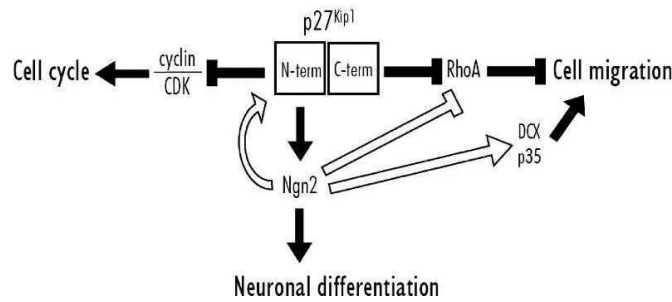
### 10.2.2 p27Kip1

La protéine p27Kip1 est un inhibiteur des cyclines dépendantes des kinases (CDKs). Des expériences d'inactivation et de surexpression montrent que p27Kip1 est impliquée dans la sortie du cycle de prolifération dans de nombreux tissus, dont la zone ventriculaire corticale. Au niveau cellulaire, p27Kip1 est phosphorylée par Cdk5, ce qui la protège de la dégradation. Cdk5, p35 et p27 peuvent se lier et co-localisent dans les neurones post-mitotiques (p35 n'est pas exprimé dans les progéniteurs). Des études *in vitro* montrent que p27Kip1 est localisée dans le noyau et dans le cytoplasme des cellules (HepG2), et sa localisation cytoplasmique qui dépend de sa phosphorylation par Cdk5 participe à la migration cellulaire.

*In vivo*, l'inactivation de p27Kip1 entraîne un défaut de la migration neuronale. Dans la ZI basse, les neurones multipolaires s'arrondissent et sont incapables de migrer, présentant des processus moins riches en actine-F, plus fins et moins nombreux. Dans la ZI superficielle, les neurones sont aussi incapables de migrer mais conservent leur morphologie bipolaire (Kawauchi et al. 2006).

L'action de p27Kip1 pourrait passer par la cofiline. La cofiline est une protéine qui séquestre les monomères d'actine, et dont la phosphorylation inhibe son activité. L'inhibition de l'activité de Cdk5 augmente la phosphorylation de la cofiline et entraîne ainsi une augmentation des formes inactives de la cofiline. Or cette activité est dépendante de la présence de p27Kip1 (Reiner et Sapir 2006). Ainsi, l'action synergique de p27Kip1 et Cdk5 pourrait contrôler l'activité de la cofiline et le remodelage du cytosquelette d'actine.

Enfin, il a été montré que p27Kip1 stabilise la Neurogénine2 (*Ngn2*), protéine impliquée dans la différenciation des neurones corticaux (Fig.90 ; Nguyen et al. 2006).



**Fig.90 Rôles de p27Kip1 dans la neurogenèse.** (Nguyen et al. 2006)

Ajoutons enfin que la protéine p57, autre membre de la famille des inhibiteurs des CDKs, est aussi impliquée dans la migration neuronale dans le cortex, comme le montre l'étude du cortex de souris KO pour p57. Le rôle de p57 n'est pas encore élucidé : p57 pourrait séquestrer la LIM-kinase dans le noyau et ainsi lever une inhibition sur la cofiline cytoplasmique. Néanmoins, aucun défaut majeur du cytosquelette d'actine n'a été détecté pour le moment dans les neurones KO pour p57 (Itoh et al. 2007).

### 10.2.3 Gα12/13

Les protéines-G hétérotrimériques Gα12 et Gα13 lient les récepteurs couplés aux protéines G au cytosquelette d'acto-myosine. L'inactivation conditionnelle des sous-unités α des protéines Gα12 et Gα13 dans le système nerveux produit des cortex cérébral et cérébelleux ectopiques, dus à une migration neuronale trop importante.

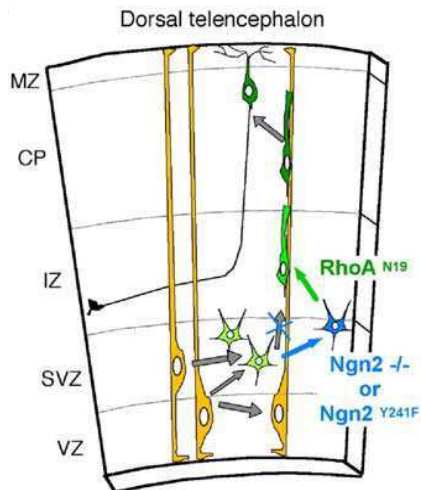
Chez les souris mutantes, l'organisation de la glie radiaire et de la lame basale n'est pas perturbée, et les cellules de Cajal-Retzius sont présentes. L'absence des sous-unités α G12/G13 entraîne une incapacité du neurone à rétracter ses neurites et à répondre à de l'acide lyso-phosphatidique (LPA). Ceci présume de la perte de réponse de ces cellules à des signaux répulsifs médiés par des récepteurs couplés à des protéines-G (Moers et al. 2007). Ainsi, les récepteurs couplés aux protéines Gα12/13 seraient nécessaires à la transduction de signaux d'arrêt lors de la migration neuronale dans le cortex et dans le cervelet. Les protéines Gα12 et Gα13 activent respectivement la kinase GSK3β et RhoA (qui elle-même active la GSK3β), ce qui permet la réorganisation des cytosquelettes de microtubules et d'actine (Sayas et al. 2002). La transduction d'un signal stop pourrait passer par la réorganisation des cytosquelettes de microtubules et d'actine par l'intermédiaire des protéines Gα12/13.

### 10.2.4 RhoA-ROCK1/2

L'inhibition de RhoA par p190RhoGAP induite par l'adhérence aux intégrines stimule la polarisation et la migration de types cellulaires non-neuronaux (Arthur et Burridge 2001). Dans le cortex embryonnaire RhoA est fortement exprimée dans la zone ventriculaire et la zone sous-ventriculaire, et la migration neuronale radiale nécessite l'inhibition de RhoA par la Ngn2 (Fig.91 ; Olenik et al. 1999 ; Kholmanskikh et al. 2003 ; Hand et al. 2005). De plus, l'expression d'un dominant-négatif de RhoA ou l'inhibition pharmacologique des protéines ROCK1/2 entraîne une récupération des défauts de migration dans les neurones Lis1 (+/-) (Kholmanskikh et al. 2007) ou induits par l'inactivation de p27Kip1 (Nguyen et al. 2006). En outre, l'application *in vitro* de LPA (Acide Lyso-Phosphatidique), qui active la voie RhoA-ROCK1/2, entraîne une rétraction neuritique des neurones corticaux et un 'arrondissement' de leur corps cellulaire, qui s'accompagne d'une inhibition de leur migration. De la même manière, le LPA inhiberait *in vivo* la migration des neurones corticaux (Fukushima et al. 2002).

Bien que l'effet inhibiteur du LPA sur la migration des neurones corticaux *in vivo* soit discutable (il est peut-être en effet indirect) il apparaît que l'activation de la voie RhoA-ROCK1/2 inhibe la migration radiale des neurones corticaux.

Ainsi, ces résultats suggèrent que l'activité de la voie RhoA-ROCK1/2 est contrôlée négativement au cours de la migration neuronale radiale.



**Fig.91 L'inactivation de RhoA par la Ngn2 est nécessaire à la migration radiale des neurones corticaux.**

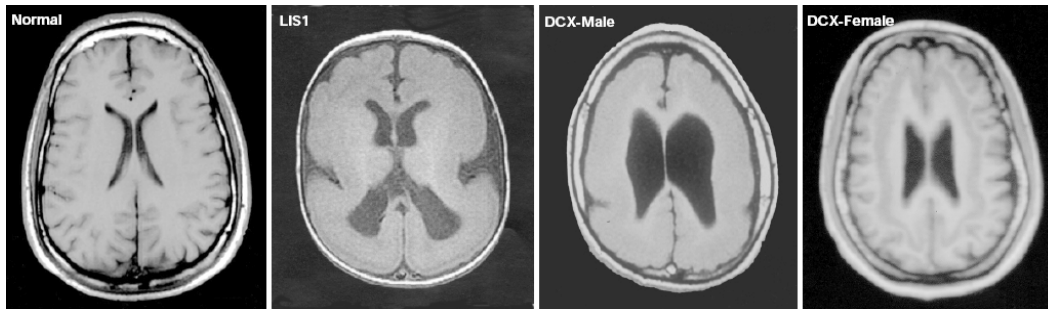
(Hand et al. 2005)

## 11 Les défauts de la migration neuronale chez l'homme et les protéines impliquées

Des malformations plus ou moins visibles de la structure du cortex résultent de défauts qui peuvent se situer à l'une (ou à plusieurs) des étapes qui constituent la neurogenèse : prolifération neuronale, migration neuronale, différenciation et mise en place des réseaux fonctionnels neuronaux (Francis et al. 2006). Ces malformations corticales s'accompagnent de désordres neurologiques variés, et sont causées par la mutation de protéines qui contrôlent pour la plupart les remaniements du cytosquelette. Nous nous limiterons ici aux protéines impliquées dans des défauts de migration neuronale. Chez l'homme, en effet, des anomalies plus ou moins sévères de la structure du cortex sont causées par des défauts de la migration neuronale pendant le développement embryonnaire.

### 11.1 Lissencéphalie de type I et protéines Dcx et Lis1

La lissencéphalie de type I correspond à un défaut de structure du cortex, qui est alors lisse, sans circonvolutions (Jellinger et Rett 1976). Les cerveaux de patients atteints de lissencéphalie de type I présentent une absence (agyrie) ou une diminution (pachygyrie) des gyri et sulci couvrant la surface corticale (Aicardi, 1991 ; Harding 1996). Le cortex dans les lissencéphalies de type I ne possède que 4 couches au lieu des 6 classiques (Jellinger et Rett 1976). Les mutations responsables de cette pathologie touchent les protéines doublecortine (Dcx) et Lis1 (dans le syndrome de Miller-Dieker), et sont de type liée à l'X et autosomale respectivement (Fig.92 ; Reiner et al. 1993 ; Des Portes et al. 1998 ; Gleeson et al. 1998). La lissencéphalie par mutation de Dcx fut identifiée dans des études familiales où les garçons sont porteurs d'une lissencéphalie et les filles d'une hétérotopie laminaire sous-corticale, encore appelé 'double-cortex' (Fig.92 ; Pinard et al. 1994 ; Des Portes et al. 1998b ; Pilz et al. 1999). L'hétérotopie laminaire sous-corticale correspond alors à une couche supplémentaire de neurones située dans la substance blanche.



**Fig.92 Cerveau normal et de patients porteurs de mutations de la protéine Lis1 ou Doublecortine.**  
(Feng et Walsh 2001)

## 11.2 Dyslexie

La dyslexie est un déficit à la lecture et à l'écriture, assez largement répandu (5-17% de la population), qui n'est pas imputable au niveau intellectuel de l'individu ni à un déficit sensoriel ou un manque d'environnement favorable (Meng et al. 2005 ; Williams et O'Donovan 2006). En 1985, des malformations corticales ont été observées chez plusieurs individus dyslexiques. Elles consistaient en des ectopies et des dysplasies, notamment localisées au niveau des scissures de Sylvius, et surtout sur l'hémisphère gauche (Galaburda et al. 1985). Ces observations furent généralisées par la suite, et il fut souvent mis en évidence des hétérotopies et des dysplasies des couches corticales et des hétérotopies nodulaires péri-ventriculaires. Récemment, plusieurs gènes de susceptibilité à la dyslexie ont été mis en évidence : KIAA0319, DYX1C1 et DCDC2 (Francks et al. 2004 ; Cope et al. 2005 ; Taipale et al. 2003 ; Meng et al. 2005). DCDC2 code pour une protéine similaire dans sa structure et sa fonction à la protéine doublecortine. Des expériences *in vivo* chez le rat montrent que Dcdc2 et Dyx1c1 contrôlent la migration neuronale. L'inactivation de Dyx1c1 entraîne en particulier une accumulation dans la zone intermédiaire de neurones multipolaires (Meng et al. 2005 ; Wang et al. 2006), et la formation d'hétérotopies nodulaires péri-ventriculaires (Rosen et al. 2007). En outre, dans ces expériences, l'hippocampe est une région particulièrement touchée, et ses défauts corrént à des déficits d'apprentissage spatial (Threlkeld et al. 2007).

## 11.3 L'hétérotopie péri-ventriculaire et la FilamineA

L'hétérotopie péri-ventriculaire (HPV) est caractérisée par l'existence de nodules de neurones hétérotopiques de neurones pyramidaux et d'interneurones corticaux au niveau de la surface ventriculaire (Hannan et al. 1999 ; Kakita et al. 2002 ; Thom et al. 2004). Cette malformation corticale est causée par la mutation d'un gène porté par le chromosome X, codant pour la filamineA, protéine de liaison à l'actine (Fox et al. 1998 ; Sheen et al. 2001). Cette mutation chez les femmes hétérozygotes entraîne une HPV souvent associée à une épilepsie. Chez les hommes homozygotes, l'effet est le plus souvent léthal de façon précoce (Lu et Sheen 2005), bien que certains hommes vivent avec une HPV et une probable absence de fonction de la filamineA.

Une forme d'HPV est associée avec une microcéphalie et implique la mutation du gène codant pour la protéine BIG2 (ou ARFGEF2) (Sheen et al. 2004). Cette protéine, exprimée dans les progéniteurs neuronaux et dans les neurones post-mitotiques en migration, est impliquée dans le trafic membranaire entre l'appareil de Golgi et les autres compartiments vésiculaires intra-cellulaires. Ce qui n'est pas clair actuellement au sujet de l'HPV est le fait que seulement une proportion des neurones n'arrive pas à migrer dans un cortex correctement formé.

La filamineA participe au passage de la phase de migration multipolaire des neurones à la phase de migration radiale, comme illustré par les expériences d'inactivation par RNAi ou d'expression forcée (Nagano et al. 2004 ; Dobyns et al. 1997 ; Sheen et Walsh 2003 ; Bai et al. 2003). De façon cohérente, l'expression d'un dominant-négatif de la filamineA produit des neurones à morphologie multipolaire incapables de migrer, et en revanche la surexpression de Filip1, protéine qui dégrade la FilamineA, entraîne l'effet inverse, une augmentation des neurones à morphologie bipolaire (Nagano et al. 2002). La FilamineA est donc nécessaire au mode de migration multipolaire et contrôle probablement le passage vers le mode de migration bipolaire (LoTurco et Bai 2006), ce qui pourrait expliquer le phénotype observé chez les patients atteints d'HPV.

L'action de la Filamine A pourrait passer par sa régulation des Rho-GTPases Rac1, Cdc42 et RhoA et son contrôle des cytosquelettes d'actine et de microtubules. La FilamineA contrôle la distribution intracellulaire de la protéine Trio, activatrice de Rac1. Trio pourrait ainsi coopérer avec STEF/Tiam1 pour activer Rac1 et induire un comportement migratoire multipolaire dans la ZI (Bellanger et al. 2000). De plus, la FilamineA peut aussi inhiber Rac1 par le recrutement de FilGAP (FLNa-binding Rho-GTPase-activating Protein)(Ohta et al. 2006). Enfin, la FilamineA inhibe directement l'activité de Rho par le recrutement de la protéine p190RhoGAP (Mammoto et al. 2006). Ainsi, le contrôle du mode de migration multipolaire par la FilamineA est probablement un processus très complexe et très intégré.

#### **11.4 La pachygyrie et le rôle de la Reelin**

Une pachygyrie correspond à la présence de circonvolutions corticales trop épaisses et trop peu nombreuses. Elle peut être causée par la mutation de la protéine Reelin (Hong et al. 2000). Les défauts de formation du cortex sont alors associés à des anomalies au niveau du cervelet, de l'hippocampe et du tronc cérébral. Ces anomalies se retrouvent chez les souris mutantes pour la Reelin, ou souris *reeler* (Lambert de Rouvroit et Goffinet 1998).

La Reelin est principalement produite par les cellules de Cajal-Retzius dans le cortex en développement (D'Arcangelo et al. 1995 ; Rice et Curran 2001 ; Tissir et Goffinet 2003 ; pour revue Soriano et del Rio 2005). L'absence de Reelin, grande protéine extracellulaire, entraîne des effets dévastateurs sur la migration neuronale et la lamination corticale. Chez les mutants *reeler*, la préplaque ne se divise pas, et le cortex se forme selon une séquence inversée de type outside-in (extérieur-intérieur)(Falconer 1951). Ce phénotype est retrouvé chez les mutants des récepteurs pour la Reelin ApoER2 (Apolipoprotéine Receptor type 2) et VLDR (Very Low Density lipoprotein Receptor), et les mutants Dab1, mutants *scrambler*. La voie de signalisation qui découle de la fixation de la Reelin à ses récepteurs induit en effet le recrutement de Dab1, un adaptateur cytoplasmique, qui est ensuite phosphorylée par Fyn, membre de la famille des Src kinases (Bock et al. 2003 ; Arnaud et al. 2003). Ceci amène l'activation de différentes voies de signalisation dont les voies PI3K-Akt-GSK3 $\beta$ -MAP1B et Crk-C3G-Rap1 (Ballif et al. 2004 ; Chen et al. 2004 ; Huang et al. 2004 ; Gonzalez-Billault et al. 2005).

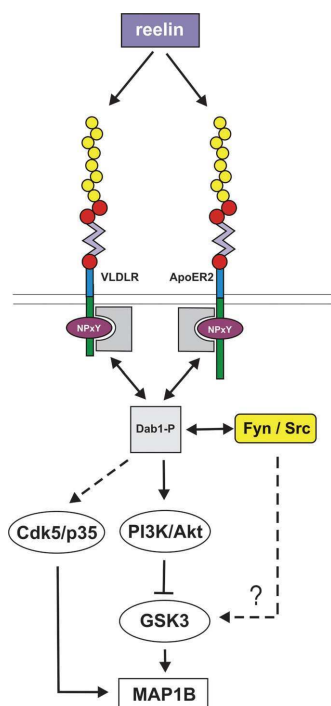
La Reelin pourrait agir comme un signal stop et/ou comme un signal attractif dans le cortex. En effet, des concentrations élevées de Reelin soluble inhibent la migration neuronale dans le cortex en développement (Dulabon et al. 2000). De plus, la Reelin est surtout concentrée dans la couche I, couche que les neurones normalement n'atteignent pas. Mais cette hypothèse n'explique pas le phénotype du mutant *reeler*. En effet, si un signal stop de la couche I était supprimé, chez le mutant *reeler* les neurones devraient s'accumuler dans ou sous la couche I

après avoir migré. Mais les neurones s'accumulent plus en profondeur du cortex, dans la zone intermédiaire et la plaque corticale, sans atteindre la couche I (Caviness et al. 1982). Ce phénotype suggère donc que la Reelin agit plutôt en stimulant la migration des neurones vers les couches superficielles du cortex et la couche I.

Dab1 contrôlerait la migration des neurones et leur détachement de leur support radiaire (Sanada et al. 2004). La Reelin pourrait ainsi jouer un rôle dans le détachement des neurones, comme illustré par le détachement de neurones du RMS cultivés en présence de Reelin (Kim et al. 2002 ; Hack et al. 2002 ; Sanada et al. 2004). Cette action passerait par les intégrines  $\alpha3\beta1$ , qui serviraient de co-récepteur. De plus, Dab1 contrôle les mouvements nucléaires dans le système visuel de la drosophile (Pramatarova et al. 2006) et interagit avec Lis1 selon un mécanisme initié par la Reelin (Assadi et al. 2003), ce qui fait de cette protéine un bon candidat pour contrôler la nucléokinèse des neurones en migration. La Reelin pourrait en outre jouer le rôle de facteur attractif, directement ou indirectement, en ancrant des facteurs extracellulaires diffusibles sur les neurones en migration.

La Reelin pourrait donc stimuler ou inhiber la migration neuronale, et les mécanismes en jeu semblent très complexes. La Reelin jouerait alors des rôles multiples :

- 1) stimuler les neurones en migration dans la zone intermédiaire et la plaque corticale,
- 2) détacher les neurones de leur substrat de migration, puis
- 3) empêcher les neurones de pénétrer dans la couche I par la suite.



**Fig.93 Voie de signalisation de la Reelin.**  
(Gonzalez-Billault et al. 2005)

Récemment, un rôle physiologique du précurseur de la  $\beta$ -Amyloïde (APP) a été démontré dans le contrôle de la migration neuronale (Young-Pearse et al. 2007), rôle qui pourrait passer par Dab-1. En effet, une perte de fonction du gène codant pour l'APP (Amyloïd Precursor Protein) augmente la sévérité du phénotype *scrambler*. La signalisation qui passe par l'APP et qui phosphoryle Dab1 pourrait ainsi contrôler le positionnement du noyau dans les neurones en migration (Pramatarova et al. 2006).

Enfin, les conséquences des défauts de signalisation de la Reelin pourraient être dûs à un défaut de stabilisation des microtubules par MAP1B. En effet, MAP1B est une MAP qui sous

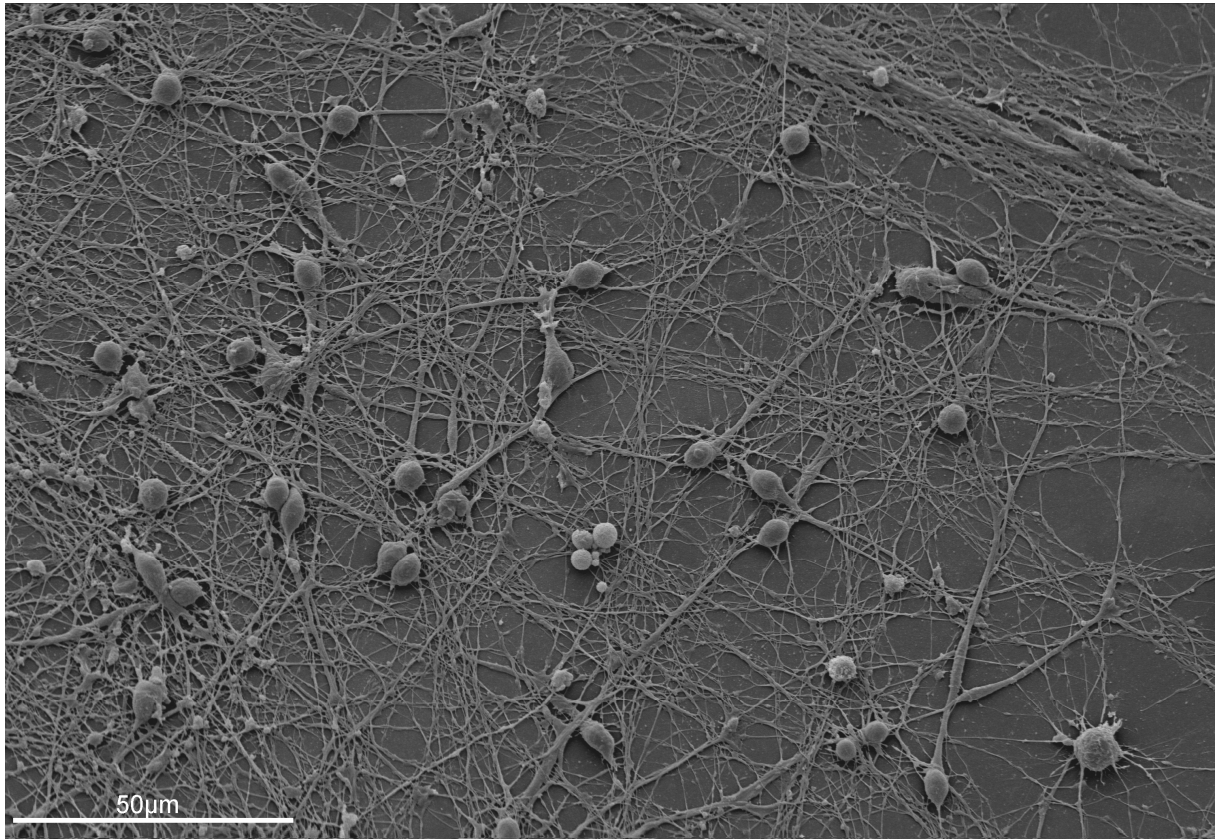


sa forme déphosphorylée stabilise les microtubules. MAP1B peut être phosphorylée et donc inactivée par la kinase GSK3 $\beta$  (revue dans Gonzalez-Billaut 2004). La surexpression de MAP1B conduit à une sur-stabilisation des microtubules qui inhibe la migration des neurones corticaux *in-vivo* (Kawauchi et al. 2005) et les souris KO pour MAP1B présentent des défauts de lamination corticale, signes de défauts de la migration neuronale (Gonzalez-Billaut et al. 2005).

Ajoutons pour conclure sur ce chapitre sur la Reelin qu'il semblerait que cette protéine soit impliquée dans une vaste gamme de désordres neurologiques comme l'épilepsie, l'autisme, la schizophrénie ou les syndrômes bipolaires (Soriano et del Rio 2005).

### **11.5 Syndrome de Zellweger**

Le syndrome de Zellweger est associé à une microgyrie ou une pachygyrie, un cortex fin, des hétérotopies sous-corticales et des dysplasies de l'olive inférieure. Ce syndrome serait lié à des défauts de migration neuronale, et causé par un dysfonctionnement des peroxysomes, notamment de leur biogenèse. L'analyse du cortex des souris mutantes pour la Peroxine5 révèle des défauts de migration neuronale et de maturation, et une mort neuronale excessive (Baes et al. 1997).



*Vue en microscopie électronique à balayage d'interneurones corticaux en migration sur des axones de cortex.*

## ***RESULTATS***

***ARTICLE 1***

A mon arrivée en 2004 dans l'équipe de Christine Métin, Arnaud Bellion, le précédent étudiant en thèse, venait de caractériser le cycle de migration des interneurons corticaux.

Il apparaissait, grâce à ses études, que les interneurons corticaux présentent un cycle de migration stéréotypé qui comprend deux phases :

1) une phase de pause du noyau, pendant laquelle se forme un renflement à distance du noyau dans le neurite de tête.

Pendant cette phase les cônes de croissance se divisent et les neurites s'allongent.

2) une phase de translocation rapide du noyau dans le renflement.

Pendant cette phase les neurites s'allongent ou se rétractent.

Mon premier travail a été de caractériser le renflement qui se forme à l'avant du noyau pendant sa phase de pause. Par des marquages immunocytochimiques et des observations en microscopie électronique, j'ai découvert que le centrosome et l'appareil de Golgi sont localisés dans le renflement. Ces observations ont de plus suggéré que ces deux organites subissent d'importants remaniement morphologiques lors de leur migration dans le neurite de tête : les centrioles sont capables de se séparer l'un de l'autre et l'appareil de Golgi s'étire. Une fois dans le renflement, les deux centrioles se ré-associent et l'appareil de Golgi se recomacte.

J'ai ensuite étudié si la myosine II non-musculaire pouvait jouer un rôle moteur dans la translocation nucléaire. Un inhibiteur spécifique de la myosine non musculaire de type II, la blebbistatine, venait d'être décrit. J'ai appliqué cet inhibiteur sur des co-cultures d'explants d'EGM/cellules corticales dissociées et explants d'EGM/tapis d'axones corticaux. Le suivi en temps réel du comportement migratoire des cellules associé à ce traitement pharmacologique a démontré l'implication de la myosine II non-musculaire dans la nucléokinèse des interneurons corticaux. Les marquages immunocytochimiques de la myosine II ont de plus mis en évidence une accumulation des filaments de myosine II à l'arrière du soma des cellules en phase de translocation nucléaire, facilement identifiables à la morphologie des cellules et celle du noyau (en ogive) en particulier. J'ai montré que l'activation de la myosine II non-musculaire à l'arrière du noyau propulse celui-ci lors de la nucléokinèse des interneurons corticaux.

Ainsi, mes premiers travaux ont mis en évidence que le complexe centrosome/appareil de Golgi est capable de migrer à distance du noyau pendant sa phase stationnaire, puis le noyau rejoint le centrosome et l'appareil de Golgi par une poussée du système d'acto-myosine.

# Nucleokinesis in Tangentially Migrating Neurons Comprises Two Alternating Phases: Forward Migration of the Golgi/Centrosome Associated with Centrosome Splitting and Myosin Contraction at the Rear

Arnaud Bellion,<sup>2\*</sup> Jean-Pierre Baudoin,<sup>1\*</sup> Chantal Alvarez,<sup>1</sup> Michel Bornens,<sup>3</sup> and Christine Métin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Unité 616, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Paris 6, Institut Fédératif de Recherche des Sciences 70, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 75651 Paris Cédex 13, France, <sup>2</sup>Unité Mixte de Recherche 8542, Centre National de la Recherche Scientifique, Ecole Normale Supérieure, Equipe Régionalisation Nerveuse, 75230 Paris Cédex 05, France, and <sup>3</sup>Unité Mixte de Recherche 144, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Curie, 75248 Paris Cédex 05, France

During rodent cortex development, cells born in the medial ganglionic eminence (MGE) of the basal telencephalon reach the embryonic cortex by tangential migration and differentiate as interneurons. Migrating MGE cells exhibit a saltatory progression of the nucleus and continuously extend and retract branches in their neuritic arbor. We have analyzed the migration cycle of these neurons using *in vitro* models.

We show that the nucleokinesis in MGE cells comprises two phases. First, cytoplasmic organelles migrate forward, and second, the nucleus translocates toward these organelles. During the first phase, a large swelling that contains the centrosome and the Golgi apparatus separates from the perinuclear compartment and moves rostrally into the leading neurite, up to 30  $\mu\text{m}$  from the waiting nucleus. This long-distance migration is associated with a splitting of the centrioles that line up along a linear Golgi apparatus. It is followed by the second, dynamic phase of nuclear translocation toward the displaced centrosome and Golgi apparatus.

The forward movement of the nucleus is blocked by blebbistatin, a specific inhibitor of nonmuscle myosin II. Because myosin II accumulates at the rear of migrating MGE cells, actomyosin contraction likely plays a prominent role to drive forward translocations of the nucleus toward the centrosome. During this phase of nuclear translocation, the leading growth cone either stops migrating or divides, showing a tight correlation between leading edge movements and nuclear movements.

**Key words:** migration; video microscopy; cortical interneurons; centrosome; Golgi apparatus; nonmuscle myosin II

## Introduction

The cerebral cortex comprises two major functional populations of neurons born in different forebrain territories. Excitatory cortical neurons are generated in the dorsal telencephalon (Gorski et al., 2002), whereas a large population of inhibitory cortical interneurons originate in the medial ganglionic eminence (MGE) of

the basal forebrain (Anderson et al., 1997; Lavdas et al., 1999; Wichterle et al., 2001) (for review, see Marin and Rubenstein, 2001). To reach the developing cortex, inhibitory interneurons migrate tangentially to the brain surface over long distances across various territories and cell substrates comprising progenitors in the subventricular zone, corticofugal axons in the intermediate zone, and postmitotic neurons in the developing cortex (Lavdas et al., 1999; Denaxa et al., 2001; Tanaka et al., 2003). A large variety of cues, neurotransmitters, growth factors, motogenic factors, or guidance molecules guide the journey of these neurons, in particular repulsive cues expressed in the basal telencephalon and attractive/missive factors expressed in the dorsal cortex (Behar et al., 1996; Denaxa et al., 2001; Powell et al., 2001; Polleux et al., 2002; Marin et al., 2003; Wichterle et al., 2003).

During migration, future cortical interneurons exhibit saltatory nuclear movements and develop a branched leading process that undergoes complex morphological changes (Nadarajah et al., 2002; Polleux et al., 2002; Ang et al., 2003; Moya and Valdeolmillos, 2004). The present study was aimed at better analyzing these changes and the full migration cycle of cortical interneu-

Received March 16, 2005; revised May 1, 2005; accepted May 2, 2005.

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and grants from the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC; number 5934) and from the Fédération pour la Recherche sur le Cerveau to C.M. A.B. was funded by a fellowship from the ARC, and J.-P.B. was funded by a fellowship from the French Ministère de la Recherche et de la Technologie. We thank Antoine Triller for helping A.B. with video microscopy during initial stages of this work and Claude-Marie Bachelet and Jean-Paul Rio for helpful assistance with video microscopy and electron microscopy. Fiona Francis, Patricia Gaspar, Alain Prochiantz, Nicole Ropert, Antoine Triller, and Marion Wassef are acknowledged for their helpful comments at different stages of the preparation of this manuscript. Marion Wassef and Patricia Gaspar are acknowledged for their support during this work.

\*A.B. and J.-P.B. contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to Dr. C. Métin, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 616, Développement Normal et Pathologique du Cerveau, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 47 Boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cédex 13, France. E-mail: metin@chups.jussieu.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.1030-05.2005

Copyright © 2005 Society for Neuroscience 0270-6474/05/255691-09\$15.00/0

rons. In particular, we wanted to determine whether interneuron migration encompasses the three successive steps classically described in migrating cells: (1) extension of a leading process, (2) migration of the nucleus in this process, and (3) retraction of the trailing process (Morris et al., 1998; Walsh and Goffinet, 2000; Ridley et al., 2003).

It can be difficult to perform exact correlations of nuclear movements with transformations of branched neurites in explant or slice cultures because of their complex three-dimensional structure (Ang et al., 2003; Moya and Valdeolmillos, 2004). To perform a quantitative study of the nuclear and neuritic movements in cortical interneurons, we therefore allowed these cells to migrate in just one plane. MGE cells that give rise to a large population of cortical interneurons (Lavdas et al., 1999; Wichterle et al., 2001; Bellion and Métin, 2005) were thus cultured on a flat permissive migration substrate that consisted of either dissociated cortical cells or cortical axons.

Video microscopy analyses showed that forward nuclear movements in MGE cells are preceded by the long-distance migration of cytoplasmic organelles that form a swelling in the leading neurite. Using photonic and electronic microscopy, we show that the cytoplasmic swelling contains the centrosome and Golgi apparatus, which both undergo drastic morphological transformations when they migrate rostrally: the centrosome splits, and the Golgi apparatus acquires a linear conformation. A second unexpected result of our study was that myosin II transiently accumulates at the rear of the soma in migrating MGE cells. Blebbistatin, a selective nonmuscular myosin II inhibitor, inhibits long-distance nuclear translocations, showing that myosin contraction moves the nucleus forward. Therefore, in MGE cells, the actomyosin system periodically generates forces that push the nucleus toward the distant centrosome. The nucleokinesis in MGE cells comprises thus two phases that are in addition correlated with leading neurite outgrowth and splitting: (1) the forward migration of centrioles and Golgi apparatus at a long distance from the nucleus is associated with leading neurite elongation, and (2) the myosin II dependent forward migration of the nucleus is correlated with leading growth cone arrest or splitting.

## Materials and Methods

**Animals.** Wild-type embryos and embryos ubiquitously expressing green fluorescent protein (GFP) were produced in the laboratory. GFP-expressing embryos resulted from crosses between OF1 females (IFFA Credo, Lyon, France) and GFP transgenic males (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). The day of vaginal plug detection was considered embryonic day 0.5 (E0.5). Pregnant females were killed by cervical dislocation to collect embryos. The embryos were dissected in cold Leibovitz medium (L15; Invitrogen, San Diego, CA).

**Grafts of MGE cells in forebrain slices.** Brain slices were prepared from E12.5–E14.5 mouse embryos. Dissected brains were embedded in 4% low-melting-point agarose (type VII; Sigma, St. Louis, MO) in L15 medium (Invitrogen). Coronal sections (100  $\mu$ m thick) were cut with a tissue slicer (Campden Instruments, Loughborough, UK) and deposited on polylysine/laminin-coated coverslips fixed to the bottom of 35 mm perforated Petri dishes with a paraffin/vaseline mixture (w/w, 90/10). Slices were covered with DMEM/F12 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 33 mM D-glucose, 3 mM sodium bicarbonate, 10 mM HEPES buffer, pH 7.4, 10 UI/ml penicillin/streptomycin, and 10% N2 and B27 complement (all from Invitrogen). Homochronic GFP-expressing MGE explants dissected as explained previously (Bellion and Métin, 2005) were grafted in the basal telencephalon of slices using glass micropipettes to transfer and inject the explants. Grafted slices were then transferred to a humidified incubator at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> and cultured for 1 d before imaging GFP-expressing MGE cells.

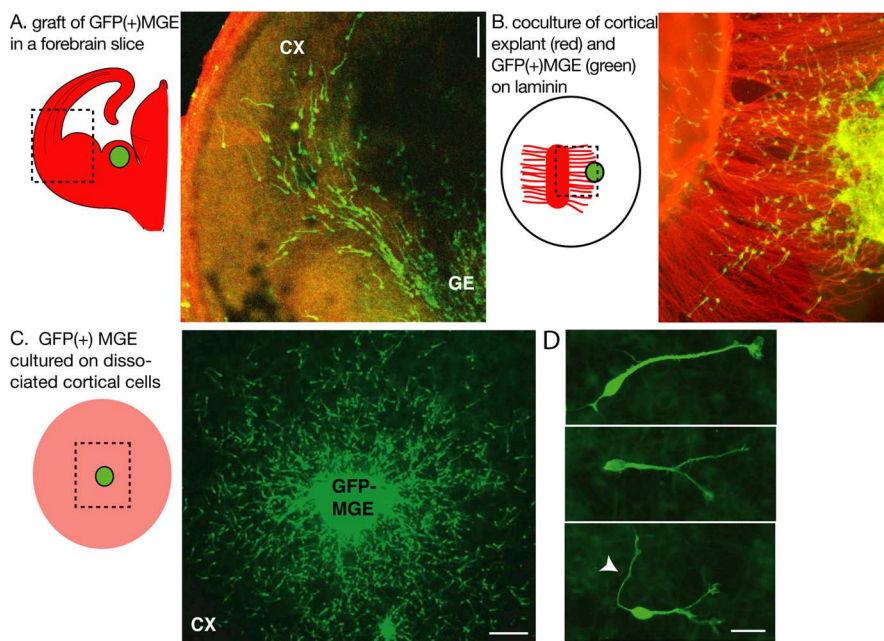
**Cocultures.** MGE explants from E12.5–E14.5 GFP-expressing embryos were deposited either on wild-type dissociated cortical cells or cortical axons extending from wild-type cortical explants. Dissociated cells were prepared from E12.5–E14.5 embryos (most often from E13.5 embryos) and cultured for 1 d before receiving EGM explants. Long cortical axons were observed around E12.5 or E13.5 cortical explants cultured for 3–5 d. Cocultures were performed on polylysine/laminin-coated glass coverslips either placed on the bottom of culture wells or fixed to the bottom of perforated Petri dishes to image migrating MGE cells (see above). To prepare cortical explants and dissociated cortical cells, rostrocaudal stripes of dorsal cortex were dissected as explained by Bellion et al. (2003). Cells were mechanically dissociated by pipeting cortical tissue in DMEM/F12 medium containing 20% fetal calf serum (Invitrogen). A mean of 4000 cells/mm<sup>2</sup> were deposited per polylysine/laminin-coated coverslip. Cortical explants and dissociated cells were cultured in DMEM/F12 medium with N2/B27 complement (see above). MGE explants were dissected in the rostral MGE (Bellion and Métin, 2005). Each explant was divided into smaller cubes (each side, 100–200  $\mu$ m), which were deposited on the same coverslip, 1 mm apart from each other on average.

**Pharmacology.** Myosin II was inhibited with blebbistatin, a specific nonmuscle myosin II inhibitor (Straight et al., 2003). Three concentrations, 50, 70, and 100  $\mu$ M, were tested in the cocultures. According to the published dose–response curves, the 70 and 100  $\mu$ M concentrations were the most efficient and gave close results.

**Time-lapse video microscopy.** Before imaging, the grafted slices or the cocultures were cultured in Petri dishes equipped with glass coverslips, the culture medium was replaced with a HEPES-buffered MEM, which was phenol red free (Sigma), containing the following: 4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 20 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 33 mM glucose, 1 mM pyruvate, 10 UI/ml penicillin/streptomycin, supplemented with N2 and B27 (Invitrogen). Two setups were successively used to acquire pictures. An inverted epifluorescence microscope (DM IRBE; Leica, Nussloch, Germany) equipped with a GFP emission/excitation filter, a humidified and thermo-regulated chamber, a mechanical shutter (Uniblitz; Vincent Associates, Rochester, NY), and a cooled CCD camera (CoolSnap HQ; PhotoMetrics, Huntington Beach, CA) was used at the beginning of this study. Pictures were captured every 3 or 5 min using a 25 $\times$  oil immersion objective. Exposure time was 200 ms, and cocultures were imaged up to 10 h. We then imaged MGE cells with an inverted epifluorescence microscope (Axiovert; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a monochromator, a motorized stage, a piezo z objective, and a humidified and thermo-regulated chamber. GFP-expressing cells were imaged through a 20 $\times$  (Plan-Apochromat) or a 40 $\times$  (Plan-Neofluar) objective every 3 or 5 min. Pictures were captured with a cooled CCD camera (Orca; Hamamatsu Photonics, Shizouka, Japan), and exposure time (500–800 ms) was controlled by the monochromator. Before pharmacological treatment, cocultures were imaged for 2–4 h. After drug application, cocultures were recorded from 6 to 12 h, depending on experiments. In both stations, image acquisition was performed using MetaMorph Software (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA). Analyses were performed using MetaMorph and ImageJ (NIH Image; National Institutes of Health, Bethesda, MD) software.

**Immunohistochemistry.** After 2 d *in vitro*, the cocultures were fixed and processed for immunocytochemistry. The GFP was visualized using either rabbit serum (1:1000; Molecular Probes, Eugene, OR) or mouse monoclonal antibodies (clone 3E6; 1:100; Quantum Biotechnologies, Montreal, Quebec, Canada). Centrin-2 was revealed with a rabbit serum (1:2000) (Middendorp et al., 2000), ninein with a rabbit serum (1:1000) (Bouckson-Castaing et al., 1996), myosin II with mouse monoclonal antibodies (clone CC212; 1:1000) (Klotz et al., 1986), and the Golgi apparatus was labeled with mouse monoclonal antibodies directed against its medial compartment (clone CTR433; 1:100) (Jasmin et al., 1989). Filamentous actin (F-actin) was labeled with Texas Red phalloidin (1:40; Molecular Probes) and tubulin with class III  $\beta$ -tubulin (TUJ1) mouse monoclonal antibodies (IgG; 1:2000; Babco, Richmond, CA). Centrin-2, ninein, and myosin II were stained in cocultures fixed 10 min in –20°C methanol. To label GFP together with the Golgi apparatus, cocultures were sequentially fixed in 4% paraformaldehyde in 0.12 M





**Figure 1.** Experimental models to study the migratory behavior of MGE cells. *A*, To image MGE cells migrating in cortical slices, MGE explants dissected from GFP-expressing embryos were grafted homotopically in wild-type forebrain slices. The experimental model is schematized on the left. The green dot represents the GFP-expressing MGE explant. The dotted frame indicates the limits of the picture shown on the right. *B* and *C* illustrate the two coculture models used in the present study. *B*, GFP-expressing MGE explants were placed at the tip of cortical axons growing on a polylysine/laminin-coated substrate. In the scheme on the left, the MGE explant is a green dot; cortical explant and cortical axons are shown in red. MGE cells migrate on cortical axons. *C*, GFP-expressing MGE explants were placed on a monolayer of wild-type dissociated cortical cells (in pink in the scheme on the left). MGE cells migrate randomly on cortical cells. *D*, MGE cells migrating on cortical cells show bifurcated or branched leading processes. In some cases, a long thin neurite is observed at the trailing side (white arrowhead). GFP-positive MGE cells were immunostained using a green fluorescent secondary antibody (*A–D*). Cortical axons were immunostained with TUJ1 antibodies using a red fluorescent secondary antibody (*B*). CX, Cortex; GE, ganglionic eminence. Scale bars: *A*, *C*, 100  $\mu\text{m}$ ; *D*, 20  $\mu\text{m}$ .

phosphate buffer (PAF)/ 0.33 M sucrose at 4°C and in  $-20^{\circ}\text{C}$  methanol. Actin and tubulin stainings were performed in cocultures fixed in PAF/0.33 M sucrose. After fixation, cocultures were rinsed in PBS and preincubated for 1 h in PBS with 10% normal goat serum (NGS)/0.2% Triton X-100. They were incubated overnight with primary antibodies diluted in PBS/2% NGS/0.2% Triton X-100. After rinses in PBS/0.2% Triton X-100 (PBT), cultures were incubated for 1 h in Alexa 488- and/or cyanine 3-coupled secondary antibodies (1:400; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) diluted in PBS/2% NGS/0.2% Triton X-100. After rinses in PBS, cultures were incubated with 0.1% bis-benzamide in PBT, rinsed in PBS, and mounted in Mowiol 1,4-diazabicyclo-[2.2.2]octane. Labelings were analyzed on an epifluorescence microscope (DMRD; Leica) equipped with a CoolSnap camera (PhotoMetrics) and on a Leica TCS confocal microscope.

**Electron microscopy.** The ultrastructure of MGE cells was studied in cells cultured on cortical axons. Cocultures performed on polylysine laminin-coated plastic coverslips (Thermanox; Nalge Nunc, Rochester, NY) were fixed in 1% PAF/1% glutaraldehyde and postfixed in 2%  $\text{OsO}_4$ . Before alcoholic dehydration and inclusion in Araldite, cultures were colored in 1% uranyl acetate in maleate buffer. Small blocks with isolated MGE cells migrating on cortical axons or with clustered MGE cells were separated from the rest of the culture. Ultrathin sections (70–80 nm) parallel to the plastic coverslips (that is, to the plane of migration of MGE cells) were collected on copper grids. They were colored with Reynolds solution and rinsed before observation with a Philips CM100 electron microscope.

## Results

### Coculture models

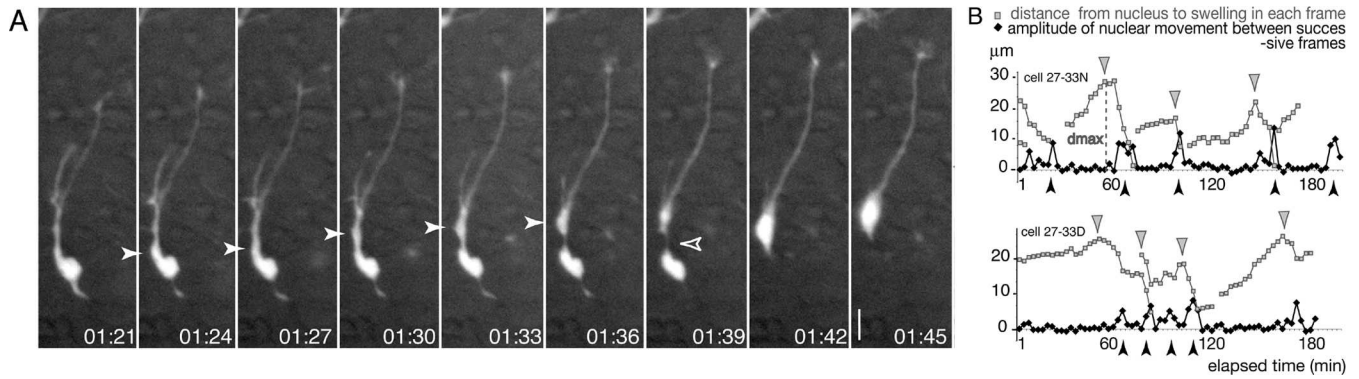
To perform quantitative analyses of the morphological changes that affect MGE cells during their migration cycle, we designed

coculture models in which MGE cells migrated on a flat surface. GFP-expressing MGE explants were deposited either on a carpet of cortical axons or on a monolayer of dissociated cortical cells (Fig. 1*B,C*). MGE cells migrated on these permissive substrates, whereas they remained as large and dense aggregates on laminin. On both cortical axons and dissociated cortical cells, MGE cells were regularly spaced as observed in organotypic forebrain slices (Fig. 1*A*) and exhibited a characteristic polarized morphology with a frequently branched leading neurite (Fig. 1*D*). They became distributed homogeneously around MGE explants deposited on dissociated cortical cells (Fig. 1*C*), suggesting that the cues that delineate their migration pathway *in vivo* and in organotypic slices are missing or more randomly distributed in dissociated cells.

### In MGE cells, nuclear translocation is preceded by the long-distance migration of cytoplasmic organelles

Using GFP antibodies and bis-benzamide staining, we verified that the large swelling at the rear of migrating MGE cells was the nucleus (see Fig. 4*A1,C1–C3*). In MGE cells migrating on cortical axons or dissociated cortical cells, the nucleus alternated between resting phases and dynamic phases of translocation toward the leading edge. During the resting phase of the nucleus, cytoplasmic organelles initially located in the perinuclear compartment migrated forward and formed a swelling that increased in size while moving rostrally in the leading neurite (Fig. 2*A*). The swelling stopped its rostral migration at 15–30  $\mu\text{m}$  from the center of the nucleus. This distance showed little variation among cells or among experiments ( $19.3 \pm 2.3 \mu\text{m}$ ; 92 measures in 43 cells) (Fig. 2*B*), suggesting a tight regulation. In a second phase, the nucleus translocated to the swelling. The duration of this second phase was most often between 3 and 9 min and rarely exceeded 12 min. This cyclically repeated two-step behavior generated a saltatory progression of the cell soma (supplemental movie 2*A*, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material).

We then verified that MGE cells exhibited the same saltatory nuclear movements in organotypic cortical slices as observed on dissociated cortical cells (Fig. 3 and supplemental movie 3*A*, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). In MGE cells migrating in E12.5–E14.5 cortical slices, long nuclear translocations were directed toward a swelling that previously differentiated in the leading neurite (Fig. 3*A*, blue squares). The mean amplitude of nuclear jumps was in the same range as that observed in cocultures (Fig. 3*B1*). In both cases, the speed of the nucleus could reach 130  $\mu\text{m}/\text{h}$  during jumps. In slices, however, the dissociation between the swelling and the perinuclear compartment was quickly followed by a nuclear translocation, whereas the dissociation could be maintained up to 60 min in cocultures (Fig. 3*B3*). Nuclear translocations were thus significantly more frequent in slices



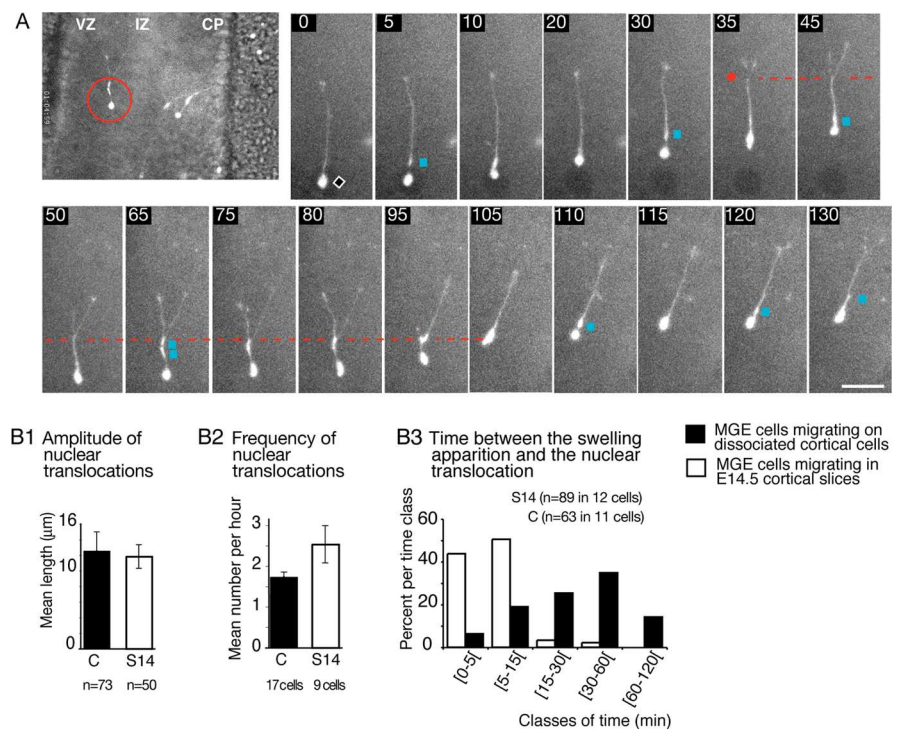
**Figure 2.** In cocultures, nuclear translocation is preceded by forward migration of perinuclear organelles. **A**, Time-lapse sequence of a GFP-expressing MGE cell migrating on wild-type dissociated cortical cells and imaged each 3 min using a 20 $\times$  objective. Before the nuclear translocation (frames 01:39, 01:42), perinuclear material (white arrowhead) moves rostrally in the leading neurite and individualizes from the perinuclear compartment to which it remains linked by a thin bridge (open arrowhead). Elapsed time is indicated in hours and minutes on each frame. Scale bar, 10  $\mu$ m. **B**, Graphs correlate the distance between the nucleus and rostral swelling (gray curves) with the successive nuclear displacements (black curves) in two cells. Nuclear translocations are represented as peaks in the black curve (black arrowheads). During waiting phases of the nucleus, the swelling moves away from the nucleus (ascending gray curve) until reaching a maximum distance (dmax; gray arrowheads). In the cell illustrated in the bottom graph, the nucleus reached the rostral swelling in two jumps.

than in cocultures (Fig. 3B2), and the mean speed of MGE cells was twice as high as in the cocultures ( $34 \pm 2.8 \mu\text{m/h}$  in E13.5 slices compared with  $18 \pm 0.4 \mu\text{m/h}$  in cocultures on E13.5 dissociated cortical cells) (supplemental Table 1, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material).

Our observations show that the nuclear migration of MGE cells is a two-step process. First, cytoplasmic organelles migrate forward at a long distance from the nucleus, and second, the nucleus translocates toward these organelles.

### Forward migration and morphological changes of the Golgi apparatus and centrosome in migrating MGE cells

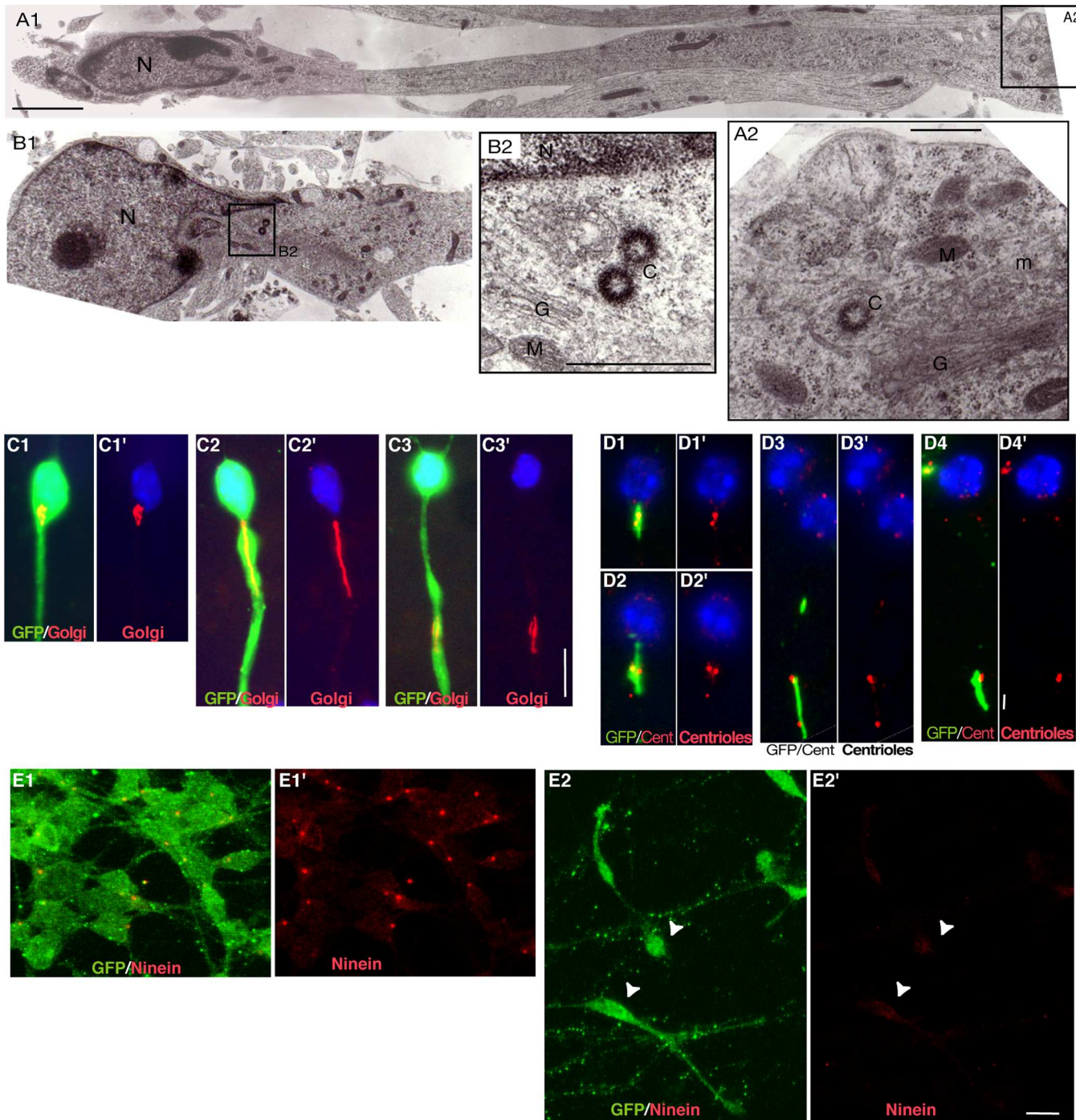
To identify the cytoplasmic organelles that perform a long-distance forward migration before each nuclear translocation, we performed an ultrastructural analysis of the proximal part of the neurite in MGE cells migrating on a substrate of cortical axons. Swellings could be observed either a long distance from (up to 15  $\mu\text{m}$ ) or close to the nucleus (Fig. 4A1, B1). The swelling comprised one or two centrioles if the plane of section passed through both centrioles, the Golgi apparatus, mitochondria, and rough endoplasmic reticulum (Fig. 4A2, B2). Golgi apparatus cisternae were always observed near centriole(s). In photonic microscopy, the Golgi apparatus presented two conformations, compact or linear, as a function of its distance from the nucleus (Fig. 4C1–C3'). The linear Golgi apparatus (Fig. 4C2) was observed in the leading process at a distance from the nucleus varying from 0 to 18  $\mu\text{m}$ . The compact Golgi apparatus (Fig. 4C1, C3) was observed either far from the nucleus (18–25  $\mu\text{m}$ ) in the rostral swelling or, most often, near the nucleus. Intermediate shapes (half compact–half linear) were occasionally ob-



**Figure 3.** MGE cells migrate faster in forebrain slices and show the same cycle of migration as on dissociated cortical cells. **A**, Time-lapse sequence shows the migration of a GFP-expressing MGE cell in an E14.5 cortical slice. In a magnified view of the imaged slice (large picture on the left), the red circle locates the cell at the limit between the ventricular zone (VZ) and the intermediate zone (IZ). As in cocultures (Fig. 2), the nuclear migration is saltatory, and nuclear translocations end near swellings (blue squares) that form during waiting periods of the nucleus (black diamond). The leading growth cone division (red diamond) is correlated with a nuclear translocation (frames 30–35) and produces a bifurcation at the leading edge. One of the two paired branches collapses and retracts. Scale bar, 20  $\mu$ m. CP, Cortical plate. **B1–B3**, Histograms show for MGE cells migrating on dissociated cortical cells (C; black bars) and for MGE cells migrating in E14.5 cortical slices (S14; white bars) that (1) the amplitude of nuclear translocations (**B1**) is the same, (2) the frequency of nuclear translocations (**B2**) is significantly increased in slices, and (3) swellings are observed for longer periods before nuclear translocation (**B3**) in cocultures (15–60 min) than in slices (<15 min). Error bars represent SE.

served (data not shown). Double immunostainings confirmed that the two centrioles were closely associated with the Golgi apparatus (Fig. 4D1–D4'). In a proportion of cells exhibiting a linear Golgi apparatus, the two centrioles were dissociated from one another and





**Figure 4.** Localization and morphology of the centrosome and Golgi apparatus in MGE cells migrating on cortical cells. **A1–B2**, Ultrastructural analysis of MGE cells migrating on cortical axons reveals the presence of the centriole(s) and Golgi apparatus in a swelling of the leading process that can be located distant from (15  $\mu\text{m}$ ; **A1**) or close to (**B1**) the nucleus. The nucleus (N) occupies one pole of the cell and shows an indentation oriented toward the leading process (Gregory et al., 1988). Swellings contain one or two centrioles (C), depending on the plane of section (**A2**, **B2**). Centrioles were always located near the Golgi apparatus (G). M, Mitochondria; ER, rough endoplasmic reticulum; m, microtubules. Scale bars: **A1**, 2  $\mu\text{m}$ ; **A2**, 500 nm; **B2**, 200 nm. **C1–C3'**, Immunostainings of GFP (green; **C1–C3**) and the medial compartment of the Golgi apparatus (CTR433 in red) in migrating MGE cells. Nuclei are labeled with bis-benzimide (blue). The Golgi apparatus is located either close to the nucleus (**C1'**) or rostrally in a swelling of the neuritic trunk (**C2'**, **C3'**). It shows a compact (**C1'**, **C3'**) or a linear (**C2'**) conformation. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ . **D1–D4'**, Immunostainings of the Golgi apparatus (CTR433 in green; **D1–D4**) and centrioles [centrin-2 (Cent) in red]. The two centrioles are associated with the Golgi apparatus (GA). In cells with a compact GA, the two centrioles appear as two close dots (**D1'**, **D2'**) or a single larger dot (**D4'**). In cells with a linear GA, the two centrioles are widely separated and line up along the GA (**D3'**). Scale bar, 2  $\mu\text{m}$ . **E1–E2'**, In GFP-positive MGE cells aggregated on laminin (**E1**, **E1'**; GFP in green), ninein antibodies (red) strongly label a single dot in the centrosome. In MGE cells migrating on cortical axons (**E2**, **E2'**; GFP in green), the ninein-positive dot is no longer visible, whereas a faint labeling of the whole soma can be observed (**E2'**; white arrowheads). Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ .

distributed along the Golgi apparatus. In these cases, the intercentriolar distance could reach up to 6  $\mu\text{m}$  (Fig. 4D3).

Therefore, in migrating MGE cells, the centrosome and the Golgi apparatus both migrate together away from the resting

nucleus and undergo striking morphological changes during this rostral movement: the centrosome splits, the Golgi apparatus stretches along the long axis of the leading neurite, and the two centrioles line up along the Golgi apparatus. The Golgi apparatus

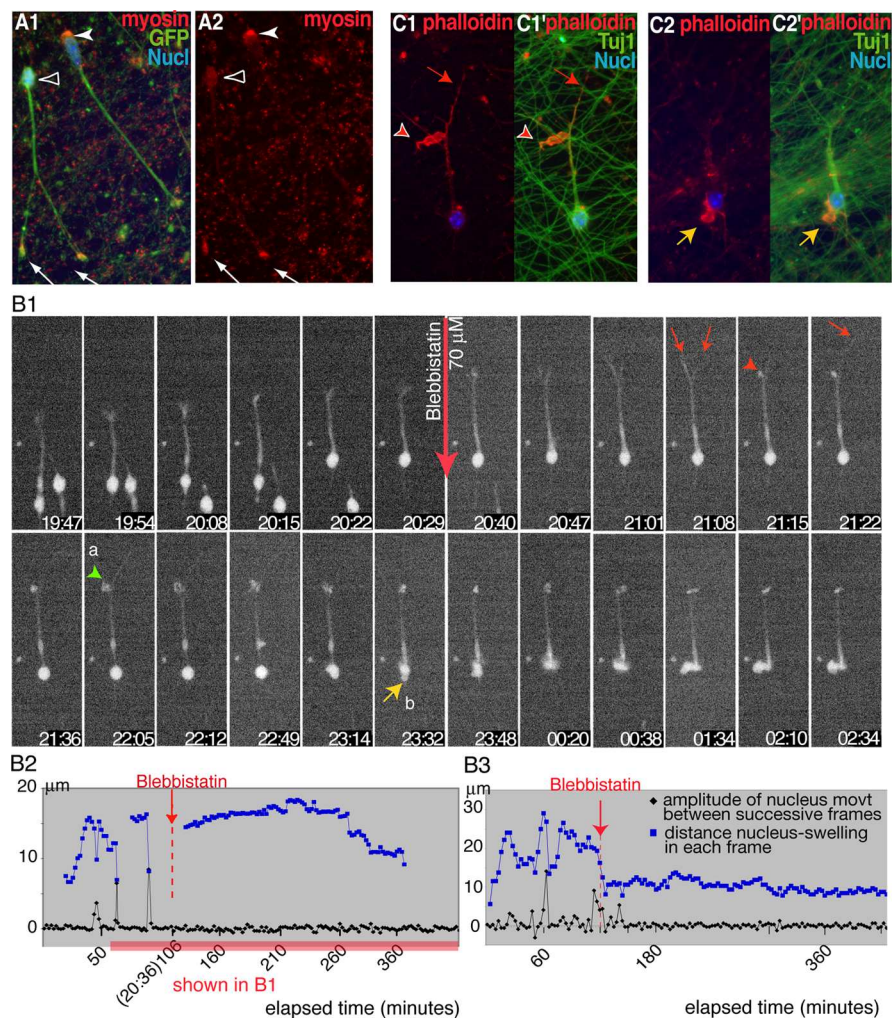
seems to fold up again, and the centrioles to reassociate at a distance from the nucleus.

### Myosin II controls the forward nuclear movements in MGE cells

In migrating neurons, microtubules of the perinuclear cage are anchored to the centrosome. They likely control nuclear movements by coupling the nucleus to the centrosome (Rivas and Hatten, 1995; Walsh and Goffinet, 2000; Xie et al., 2003; Bielas and Gleason, 2004; Solecki et al., 2004). In migrating MGE cells, however, the anchorage of microtubules to the centrosome might be weak. Indeed, a centrosomal protein, ninein, which anchors microtubules to the centrosome (Bouckson-Castaing et al., 1996; Abal et al., 2002), was concentrated at the centrosome in nonmigrating MGE cells aggregated on laminin (Fig. 4E1,E1'). This protein was no longer detected at the centrosome in MGE cells migrating on cortical axons (Fig. 4E2,E2'). This suggests that microtubules might be redistributed in other locations and/or poorly anchored to the centrosome during migration. We therefore looked for an alternative system not involving microtubules that could produce the forces needed for nuclear translocations.

We thus investigated whether the acto-myosin system could be involved in this process as already described in non-neuronal migrating cells (Sanchez-Madrid and del Pozo, 1999; Ridley et al., 2003). We observed that myosin II transiently accumulated at the rear of MGE cells during a certain phase of the migration cycle (Fig. 5A1,A2). When cocultures of MGE cells and cortical axons were treated with blebbistatin, a selective nonmuscle myosin II inhibitor, nuclear movements were inhibited in 60% of MGE cells within 30 min after application ( $n = 72$  cells) (Fig. 5B1 and supplemental movie 5B1, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). Blebbistatin at 70 or 100  $\mu\text{M}$  did not entirely abolish nuclear movements, and small amplitude shifts of the nucleus were still observed. In 71 imaged and responding cells, we observed a 68.6% decrease in the mean speed of nuclear migration (mean nuclear speed recorded 2 h before drug treatment,  $35.1 \pm 4.2 \mu\text{m}/\text{h}$ ; mean nucleus speed recorded from 1–3 h after blebbistatin exposure,  $11.1 \pm 1.3 \mu\text{m}/\text{h}$ ). Long and dynamic nuclear jumps were no longer observed, and the swelling stabilized at a short distance ahead of the nucleus (Fig. 5B2,B3).

Blebbistatin also induced striking morphological deformations in MGE cells. Large and active expansions strongly labeled with phalloidin developed at the tips of neurites, around the nucleus or the swelling (Fig. 5C1,C2). The nucleus could enter one of these lateral protrusions orienting itself perpendicularly to the



**Figure 5.** Blebbistatin, a nonmuscle myosin II inhibitor, inhibits nuclear movement in MGE cells. **A1, A2**, In GFP-positive MGE cells (**A1**; green) migrating on cortical axons, myosin II detected by CC212 antibodies (red) either concentrates at the rear of the nucleus (white arrowhead) or is distributed over the whole cell body (open arrowhead). Myosin II also accumulates in growth cones (white arrowheads). **B1–B3**, Time-lapse sequence (**B1**) shows the response of an MGE cell migrating on cortical axons to blebbistatin 70  $\mu\text{M}$  (red arrow). Time is indicated in hours and minutes on each frame. A graphic representation of the nuclear and swelling movements is shown in **B2** (same legend as Fig. 2B). **B3** illustrates similar movements in another treated MGE cell. Nuclear translocations occur during the control period (frames 19:54 and 20:22 in **B1**, peaks of the black curves in **B2** and **B3**) and are no longer observed after drug treatment. Blebbistatin stabilizes the swelling (blue curve) ahead of the nucleus. In **B1**, 45 min after drug application, one of the two leading neurites retracts and forms a large protrusion (red arrowhead; frame 21:15), whereas the other neurite extends (red arrow; frame 21:22). Protrusions develop at the neuritic bifurcation (green arrowhead; a) and around the nucleus (yellow arrow; b). At the end of the sequence, the nucleus enters a lateral protrusion (frame 01:34). **C1–C2**, MGE cells migrating on cortical axons and treated with blebbistatin for 6 h were stained with phalloidin (red) and TUJ1 antibodies (green; **C1, C2**). F-actin accumulates into large protrusions at previous branching points (red arrowhead; the red arrow shows the leading neurite) and in the perinuclear compartment (yellow arrow). Nucl, Nucleus.

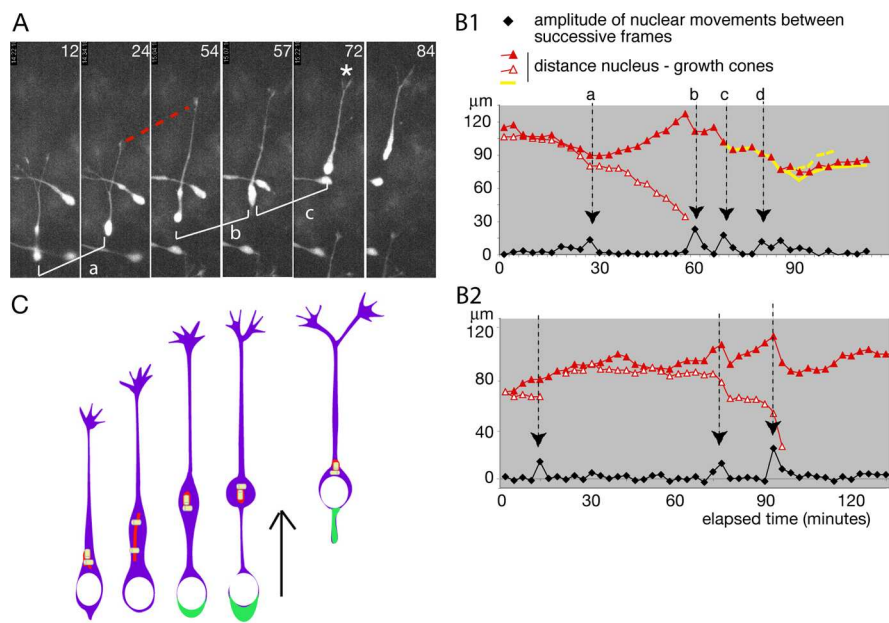
long axis of the cell. In contrast, processes that did not produce ruffles became very thin, and their tips were difficult to localize in the movies. Some MGE cells extended several long and thin branches.

Thus, nonmuscle myosin II inhibition efficiently blocked nuclear translocation in a large proportion of migrating MGE cells and induced a drastic redistribution of actin within large and motile expansions. These results thus show myosin II to be a major actor in MGE cell migration.

### The two steps of the nucleokinesis are correlated with specific transformations at the leading edge

At the leading edge of MGE cells, the growing rate of neurites showed large variations ( $45 \pm 20 \mu\text{m}/\text{h}$ ;  $n = 24$  growth cones





**Figure 6.** Neuritic elongation and nuclear migration are correlated in MGE cells. **A**, Frames of the time-lapse sequence depicted in **B1**. A GFP-expressing MGE cell migrating on wild-type dissociated cortical cells was imaged each for 3 min using a 40 $\times$  objective. Elapsed time is indicated in minutes on each frame. Three nuclear translocations (a,b,c) are illustrated. Between translocations a and b, the leading process elongates (red dotted curve). A growth cone splitting (white asterisk) is visible at the end of translocation c. **B1**, **B2**, Graphs depict the sequence of migration of two MGE cells. Graph **B1** corresponds to the cell illustrated in **A**. The black curve shows the amplitude of nuclear displacements between successive frames. Peaks in the curve (black arrows) identify translocation phases (same letters in **A** and **B1**). Colored curves represent the distance from the rostral edge of the nucleus to growth cones on each frame (leading growth cone in red). Between two nuclear translocations (black arrows), the leading neurite elongates, and the red curve hence ascends. Nuclear translocations are associated with an arrest of neuritic elongation and a shrinkage of the leading neurite. **C**, Schematic representation of nucleokinesis in MGE cells. During the resting phase of the nucleus (white), the centrioles (yellow) and Golgi apparatus (red) migrate forward, and the leading neurite elongates. The centrioles split, and the Golgi apparatus elongates. Then, myosin II accumulates at the rear of the cell body (green) and pushes the nucleus toward the centrosome/Golgi apparatus.

analyzed during 180 min). Phases of elongation alternated with growth cone pauses and/or leading growth cone splitting (Fig. 6A). Stops in neuritic elongation were correlated with nuclear translocations, whereas neurite(s) growth proceeded at the end of each nuclear translocation (Fig. 6B1, B2). In 21 cells imaged during at least 80 min, 29 of 36 (80%) divisions of a leading growth cone occurred during a nuclear translocation. The production of new branches by leading growth cone splitting were thus synchronized with forward nuclear movements. The same correlations were found in MGE cells that migrated in cortical slices (Fig. 3A and data not shown).

Therefore, morphological changes of the neuritic arbor in MGE cells were correlated with the two phases of the nucleokinesis (Fig. 6C). Neuritic elongation occurred during the forward movement of the centrosome/Golgi apparatus, whereas leading growth cone arrest or splitting was associated with the myosin II-dependent phase of forward nuclear translocation.

## Discussion

The present study shows that the migration cycle of MGE cells is remarkable in several aspects: (1) long nuclear displacements are preceded by movements of the same amplitude of the centrosome and Golgi apparatus; (2) the forward movement of the centrosome is associated with centriole splitting; (3) nuclear jumps toward the displaced centrosome are dependant on myosin II contractility; (4) transformations of the neuritic arbor at the leading edge are synchronized with phases of nuclear movement.

## Forward migration of the centrosome and Golgi apparatus in MGE cells

We show that nuclear jumps are preceded by the forward translocation of cytoplasmic organelles comprising in particular the centrosome and Golgi apparatus. These organelles segregate from the perinuclear compartment and reposition rostrally in the leading neurite in which they form a cytoplasmic swelling observable in numerous migrating neurons or glial progenitors (this study) (Kakita and Goldman, 1999; Nadarajah et al., 2002; Polleux et al., 2002; Ang et al., 2003; Moya and Valdeolmillos, 2004). The forward migration of the centrosome before nuclear translocation has also been observed in radially migrating cerebellar neurons (Solecki et al., 2004). Although the amplitude of centrosomal movement described by Solecki et al. (2004) is relatively short (1.4  $\mu$ m on average, compared with 19.3  $\mu$ m in this study), similar mechanisms might thus operate to control nucleokinesis in radially and tangentially migrating neurons. A specific property of MGE cells revealed by this study might therefore be their capacity to reposition the centrosome and Golgi apparatus at a large distance from the nucleus within the leading neurite. Interestingly, such a reorientation of the microtubule organizing center (MTOC) and Golgi apparatus has also been observed in cultured cortical interneurons during polarity reversal (Hayashi et al., 2003). In non-neuronal cells such as fibroblasts or astrocytes induced to migrate,

nuclear movements are also preceded by a large rostral movement of the centrosome and Golgi apparatus (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Palazzo et al., 2001).

In MGE cells, the maximum distance between the centrosome and the nucleus was quite constant, suggesting nevertheless a tight regulation. Indeed, in certain migrating cells, the cytoskeleton has been shown to establish a physical link between the nucleus and the centrosome (Walsh and Goffinet, 2000; Bielas and Gleason, 2004). For example, microtubules form a cage around the nucleus of cerebellar neurons (Rivas and Hatten, 1995), and a fork anchored to the centrosome covers the nucleus in cortical neurons (Xie et al., 2003). In cerebellar neurons, the proteins LIS1 and doublecortin cooperate with microtubule-associated molecular motors such as dynein to control the coupling between the nucleus and the centrosome (Tanaka et al., 2004). In addition, protein critical for neuronal migration belonging to the focal adhesion kinase/cyclin-dependent kinase 5 (FAK/cdk5) and mPar6 $\alpha$ /atypical protein kinase C (PKC $\zeta$ ) signaling pathways (Gupta et al., 2003; Jossin et al., 2003) are enriched in the centrosome or in perinuclear microtubules (Xie et al., 2003; Solecki et al., 2004). It is thus important to determine the contribution of these proteins to the relative movements of the nucleus and centrosome in MGE cells, together with the role of Rho GTPases that control the polarity of the MTOC and Golgi apparatus during migration in non-neuronal cells (Hall, 1998; Ridley et al., 2003)

and nucleokinesis in precerebellar neurons (Causseret et al., 2004).

A surprising result of our study is that a splitting of the centrosome occurs during its rostral repositioning. The two separated centrioles line up along the Golgi apparatus that forms a long tube parallel to the axis of movement of the cell. Such a linear morphology of the Golgi apparatus during migration has not been reported previously. It might result from the redistribution of proteins such as GMAP210, which stabilize microtubules and the Golgi apparatus around the centrosome (Rios et al., 2004). Centrosome splitting has not been observed in cerebellar neurons migrating *in vitro* along radial glial cells (Solecki et al., 2004; Tanaka et al., 2004). However, centriole dissociation has already been described in neutrophils induced to move by chemokinesis and in interphase fibroblasts (Schliwa et al., 1982; Piel et al., 2000). In both cases, this phenomenon was associated with the subcellular redistribution of microtubules possibly connected with the directionality of cell locomotion. Additional studies are thus needed to determine whether the dissociation of centrioles observed in MGE cells is related to the control of nuclear movement and/or to the control of the arrangement of microtubule bundles in the leading neuritic arbor. Indeed, as observed in neutrophils (Schliwa et al., 1982), centriole dissociation might permit the cell to control two bundles of microtubules independently of one another, for example when a bifurcation forms at the leading edge, or when one neuritic branch retracts while another one elongates.

#### Translocation of the nucleus toward the centrosome

A new result of our study is that nonmuscle myosin II controls nuclear movement in cortical interneurons. Recent genetic studies have revealed an important role of nonmuscle myosin II for controlling the migration of certain neuronal groups in the embryo (Ma et al., 2004). Here, we show that myosin II is important for the translocation of the nucleus toward the rostral centrosome in migrating MGE cells. We show that myosin II seems to accumulate periodically behind the nucleus, even in some cases forming a short tail at the rear of the cell. Patterns of distribution suggest that myosin II can contract the rear of the MGE cell to push the nucleus forward, as described in non-neuronal cells (Sanchez-Madrid and del Pozo, 1999; Ridley et al., 2003). The frequency of nuclear translocation might thus result from the transient accumulation of myosin II at the rear of MGE cells or from the highly regulated activation of myosin II (Matsumura et al., 1998). Indeed, intracellular  $Ca^{2+}$  transients observed just before or during nuclear movements in migrating MGE cells (Moya and Valdeolmillos, 2004) might play an important role in controlling the periodic activation of myosin II and the saltatory progression of the nucleus.

A spectacular consequence of myosin II inhibition by blebbistatin was the apparition of large and highly motile protrusions at the lateral border of the perinuclear compartment and at the tip of some neurites. These protrusions are enriched in F-actin and are reminiscent of the ruffles of migrating fibroblasts (Hall, 1998). We observed that in some cases, the nucleus rotates and enters a lateral expansion of the soma, showing that myosin II plays an important role in maintaining the nucleus aligned on the same axis with the MTOC and the leading growth cone. In *Dicystostelium* cells and fibroblasts, myosin II activity similarly restricts actin-dependant lateral membrane protrusions, thereby controlling cell polarity (Wessels and Soll, 1990; Ridley et al., 2003; Totsukawa et al., 2004). In addition to its motile function, myosin II is thus involved in maintaining a single axis of migra-

tion in MGE cells by inhibiting the formation of lateral protrusions.

Blebbistatin applied at concentrations that entirely block the ATPase activity of nonmuscle myosin II (Straight et al., 2003) did not entirely suppress nuclear movements. The smooth and residual nuclear movements might depend on microtubule-associated forces known to move the nucleus in granule cells (Rivas and Hatten, 1995; Solecki et al., 2004; Tanaka et al., 2004). Accordingly, nocodazole at low concentrations changes the dynamics of nucleokinesis in MGE cells (J.-P. Baudoin and C. Métin, unpublished data). Two sets of forces are likely therefore to control nuclear movements in tangentially migrating MGE cells: (1) microtubule-dependent pulling forces and (2) actomyosin-dependent pushing forces. Whether nonmuscle myosin II contributes to the radial migration of neurons is likely (Ma et al., 2004) but remains to be studied.

#### Correlation between nucleokinesis and neuritogenesis

Graphic analyses revealed synchronies between nuclear movements and the change in morphology of neurites. In MGE cells, the start of a long nuclear jump always coincided with a transient arrest in neuritic elongation and, frequently, with leading growth cone splitting, revealing an unanticipated link between the process of branch formation and nuclear movement. Neuritic elongation quickly resumed thereafter and was pursued during the resting period of the nucleus. During this phase, the Golgi apparatus moved forward and took on a linear conformation. Whether this forward movement of the Golgi apparatus is causal to the increase in growth rate of the leading neurite remains to be determined. Genetic studies have identified ARFGEF2, a controller of trafficking from the *trans*-Golgi network, as an important regulator of neuronal migration in the developing human cortex (Sheen et al., 2004). In fibroblasts, it is also clear that anterograde vesicle trafficking from the Golgi apparatus toward the leading edge is required for migration (Schmoranzler et al., 2003; Prigozhina and Waterman-Storer, 2004).

The migration of MGE cells is thus an integrated and cyclic process as described previously for neurons moving radially along or independently from a radial glial support (Rivas and Hatten, 1995; Nadarajah et al., 2001). Although MGE cells migrated at a slower rate on dissociated cortical cells (10–15  $\mu\text{m}/\text{h}$ ) than in organotypic slices [37.5  $\mu\text{m}/\text{h}$  in the present study; 50  $\mu\text{m}/\text{h}$  in Nadarajah et al. (2002); 58  $\mu\text{m}/\text{h}$  in Polleux et al. (2002); from 0 to 50  $\mu\text{m}/\text{h}$  in Tanaka et al. (2003)], the fundamental properties of their migration were conserved *in vitro*. In addition, the formation of diverging branches at the leading edge used by tangentially migrating cells to change their direction in organotypic slices (Kakita and Goldman, 1999; Polleux et al., 2002) is conserved *in vitro* by MGE cells. It likely depends on intrinsic properties of the MGE cells rather than on the polarized distribution of cues in the environment.

#### References

- Abal M, Piel M, Bouckson-Castaing V, Mogensen M, Sibarita JB, Bornens M (2002) Microtubule release from the centrosome in migrating cells. *J Cell Biol* 159:731–737.
- Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278:474–476.
- Ang Jr ES, Haydar TF, Gluncic V, Rakic P (2003) Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. *J Neurosci* 23:5805–5815.
- Behar TN, Li YX, Tran HT, Ma W, Dunlap V, Scott C, Barker JL (1996) GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms. *J Neurosci* 16:1808–1818.



- Bellion A, Métin C (2005) Early regionalisation of the neocortex and the medial ganglionic eminence. *Brain Res Bull*, in press.
- Bellion A, Wassef M, Metin C (2003) Early differences in axonal outgrowth, cell migration and GABAergic differentiation properties between the dorsal and lateral cortex. *Cereb Cortex* 13:203–214.
- Bielas SL, Gleeson JG (2004) Cytoskeletal-associated proteins in the migration of cortical neurons. *J Neurobiol* 58:149–159.
- Bouckson-Castaing V, Moudjou M, Ferguson DJ, Mucklow S, Belkaid Y, Milon G, Crocker PR (1996) Molecular characterisation of ninein, a new coiled-coil protein of the centrosome. *J Cell Sci* 109:179–190.
- Causeret F, Hidalgo-Sanchez M, Fort P, Backer S, Popoff MR, Gauthier-Rouviere C, Bloch-Gallego E (2004) Distinct roles of Rac1/Cdc42 and Rho/Rock for axon outgrowth and nucleokinesis of precerebellar neurons toward netrin 1. *Development* 131:2841–2852.
- Denaxa M, Chan CH, Schachner M, Parnavelas JG, Karagogeos D (2001) The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development* 128:4635–4644.
- Etienne-Manneville S, Hall A (2001) Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC $\zeta$ . *Cell* 106:489–498.
- Gorski JA, Talley T, Qiu M, Puelles L, Rubenstein JL, Jones KR (2002) Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the *Emx1*-expressing lineage. *J Neurosci* 22:6309–6314.
- Gregory WA, Edmondson JC, Hatten ME, Mason CA (1988) Cytology and neuron-glia apposition of migrating cerebellar granule cells *in vitro*. *J Neurosci* 8:1728–1738.
- Gupta A, Sanada K, Miyamoto DT, Rovelstad Miyamoto, Nadarajah B, Pearlman AL, Brunstrom J, Tsai LH (2003) Layering defect in p53 deficiency is linked to improper neuronal-glia interaction in radial migration. *Nat Neurosci* 6:1284–1291.
- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509–514.
- Hayashi K, Kawai-Hirai R, Harada A, Takata K (2003) Inhibitory neurons from fetal rat cerebral cortex exert delayed axon formation and active migration *in vitro*. *J Cell Sci* 116:4419–4428.
- Jasmin BJ, Cartaud J, Bornens M, Changeux JP (1989) Golgi apparatus in chick skeletal muscle: changes in its distribution during end plate development and after denervation. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7218–7222.
- Jossin Y, Ogawa M, Metin C, Tissir F, Goffinet AM (2003) Inhibition of SRC family kinases and non-classical protein kinases C induce a reeler-like malformation of cortical plate development. *J Neurosci* 23:9953–9959.
- Kakita A, Goldman JE (1999) Patterns and dynamics of SVZ cell migration in the postnatal forebrain: monitoring living progenitors in slice preparations. *Neuron* 23:461–472.
- Klotz C, Bordes N, Laine MC, Sandoz D, Bornens M (1986) Myosin at the apical pole of ciliated epithelial cells as revealed by a monoclonal antibody. *J Cell Biol* 103:613–619.
- Lavdas AA, Grigoriou M, Pachnis V, Parnavelas JG (1999) The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 19:7881–7888.
- Ma X, Kawamoto S, Hara Y, Adelstein RS (2004) A point mutation in the motor domain of nonmuscle myosin II-B impairs migration of distinct groups of neurons. *Mol Biol Cell* 15:2568–2579.
- Marin O, Rubenstein JL (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2:780–790.
- Marin O, Plump AS, Flames N, Sanchez-Camacho C, Tessier-Lavigne M, Rubenstein JL (2003) Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on subcortical Slit1/2-independent repulsion and cortical attraction. *Development* 130:1889–1901.
- Matsumura F, Ono S, Yamakita Y, Totsukawa G, Yamashiro S (1998) Specific localization of serine 19 phosphorylated myosin II during cell locomotion and mitosis of cultured cells. *J Cell Biol* 140:119–129.
- Middendorp S, Kuntziger T, Abraham Y, Holmes Abraham, Bordes N, Paintrand M, Paoletti A, Bornens M (2000) A role for centrin 3 in centrosome reproduction. *J Cell Biol* 148:405–416.
- Morris NR, Efimov VP, Xiang X (1998) Nuclear migration, nucleokinesis and lissencephaly. *Trends Cell Biol* 8:467–470.
- Moya F, Valdeolmillos M (2004) Polarized increase of calcium and nucleokinesis in tangentially migrating neurons. *Cereb Cortex* 14:610–618.
- Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong RO, Pearlman AL (2001) Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci* 4:143–150.
- Nadarajah B, Alifragis P, Wong RO, Parnavelas JG (2002) Ventricle-directed migration in the developing cerebral cortex. *Nat Neurosci* 5:218–224.
- Palazzo AF, Cook TA, Alberts AS, Gundersen GG (2001) mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol* 3:723–729.
- Piel M, Meyer P, Khodjakov A, Rieder CL, Bornens M (2000) The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *J Cell Biol* 149:317–330.
- Polleux F, Whitford KL, Dijkhuizen PA, Vitalis T, Ghosh A (2002) Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development* 129:3147–3160.
- Powell EM, Mars WM, Levitt P (2001) Hepatocyte growth factor/scatter factor is a motogen for interneurons migrating from the ventral to dorsal telencephalon. *Neuron* 30:79–89.
- Prigozhina NL, Waterman-Storer CM (2004) Protein kinase D-mediated anterograde membrane trafficking is required for fibroblast motility. *Curr Biol* 14:88–98.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel Burridge, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302:1704–1709.
- Rios RM, Sanchis A, Tassin AM, Fedriani C, Bornens M (2004) GMAP-210 recruits gamma-tubulin complexes to *cis*-Golgi membranes and is required for Golgi ribbon formation. *Cell* 118:323–335.
- Rivas RJ, Hatten ME (1995) Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 15:981–989.
- Sanchez-Madrid F, del Pozo MA (1999) Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J* 18:501–511.
- Schliwa M, Pryzwansky KB, Euteneuer U (1982) Centrosome splitting in neutrophils: an unusual phenomenon related to cell activation and motility. *Cell* 31:705–717.
- Schmoranzler J, Kreitzer G, Simon SM (2003) Migrating fibroblasts perform polarized, microtubule-dependent exocytosis towards the leading edge. *J Cell Sci* 116:4513–4519.
- Sheen VL, Ganesh VS, Topcu M, Sebire G, Bodell A, Hill RS, Grant PE, Shugart YY, Imitola J, Khoury SJ, Guerrini R, Walsh CA (2004) Mutations in ARFGEF2 implicate vesicle trafficking in neural progenitor proliferation and migration in the human cerebral cortex. *Nat Genet* 36:69–76.
- Solecki DJ, Model L, Gaetz J, Kapoor TM, Hatten ME (2004) Par6 $\alpha$  signaling controls glial-guided neuronal migration. *Nat Neurosci* 7:1195–1203.
- Straight AF, Cheung A, Limouze J, Chen I, Westwood NJ, Sellers JR, Mitchison TJ (2003) Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor. *Science* 299:1743–1747.
- Tanaka D, Nakaya Y, Yanagawa Y, Obata K, Murakami F (2003) Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins. *Development* 130:5803–5813.
- Tanaka T, Serneo FF, Higgins C, Gambello MJ, Wynshaw-Boris A, Gleeson JG (2004) Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *J Cell Biol* 165:709–721.
- Totsukawa G, Wu Y, Sasaki Y, Hartshorne DJ, Yamakita Y, Yamashiro S, Matsumura F (2004) Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J Cell Biol* 164:427–439.
- Walsh CA, Goffinet AM (2000) Potential mechanisms of mutations that affect neuronal migration in man and mouse. *Curr Opin Genet Dev* 10:270–274.
- Wessels D, Soll DR (1990) Myosin II heavy chain null mutant of *Dictyostelium* exhibits defective intracellular particle movement. *J Cell Biol* 111:1137–1148.
- Wichterle H, Turnbull DH, Nery S, Fishell G, Alvarez-Buylla A (2001) In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128:3759–3771.
- Wichterle H, Alvarez-Dolado M, Erskine L, Alvarez-Buylla A (2003) Permissive corridor and diffusible gradients direct medial ganglionic eminence cell migration to the neocortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:727–732.
- Xie Z, Sanada K, Samuels BA, Shih H, Tsai LH (2003) Serine 732 phosphorylation of FAK by Cdk5 is important for microtubule organization, nuclear movement, and neuronal migration. *Cell* 114:469–482.

***ARTICLE 2***

Pendant la période où je réalisais les travaux publiés dans l'article 1, j'ai pu participer à une collaboration avec Fiona Francis et son étudiante en thèse, Caroline Kappeler, du laboratoire de Jamel Chelly (Génétique des retards mentaux, hôpital Cochin).

Pour étudier le comportement migratoire des interneurons corticaux KO pour la protéine Doublecortine (Dcx), une MAP stabilisatrice des microtubules, C.Kappeler a réalisé dans notre équipe des expériences utilisant les modèles de culture *in vitro* développés par Christine Métin. C.Kappeler a pu mettre en évidence des défauts de la dynamique de migration des interneurons corticaux mutants pour Dcx (Kappeler et al. 2006).

J'ai alors recherché quel serait l'effet d'une déstabilisation directe des microtubules sur le comportement migratoire des interneurons, par une approche pharmacologique en utilisant du nocodazole.

Mes études en vidéomicroscopie en temps réel ont premièrement démontré que la stabilité des microtubules n'est pas nécessaire à la motilité des interneurons corticaux. En effet, une déstabilisation faible ou modérée des microtubules (10 à 100nM) n'affecte pas la vitesse de migration des cellules. En revanche, la vitesse diminue dans les cellules traitées avec de fortes doses de nocodazole (1µM), sans parvenir toutefois à bloquer les mouvements cellulaires. J'ai dans un deuxième temps mis en évidence que l'application de nocodazole induit des effets sur la morphologie des cellules, visibles à partir de 100nM. Ils se traduisent à des doses modérées de nocodazole (100nM) par un raccourcissement de la longueur des neurites et une simplification de l'arbre neuritique. Une forte concentration de nocodazole (1µM) affecte plus fortement la morphologie des cellules qui perdent alors leur bipolarité. Troisièmement, les transformations morphologiques sont associées à des défauts du comportement migratoire des cellules : les cellules inversent très souvent leur polarité avec un effet proportionnel à la dose de nocodazole appliquée. En particulier, les cellules traitées avec du nocodazole à une concentration de 1µM adoptent un comportement migratoire de type multipolaire.

Ces résultats suggèrent donc que la stabilité des microtubules n'est pas nécessaire à la motilité des interneurons corticaux en migration, mais qu'elle est en revanche cruciale pour que ces cellules conservent leur morphologie bipolaire et élaborent un arbre neuritique correct, et puissent ainsi migrer de façon dirigée.

# Nocodazole-Induced Changes in Microtubule Dynamics Impair the Morphology and Directionality of Migrating Medial Ganglionic Eminence Cells

Jean-Pierre Baudoin<sup>a, b</sup> Chantal Alvarez<sup>a, b</sup> Patricia Gaspar<sup>a, b</sup> Christine Métin<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>INSERM, U839, Hôpital Pitié-Salpêtrière, and <sup>b</sup>University Paris 6, Paris, France

© Free Author Copy - for personal use only

PLEASE NOTE THAT ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT.

Upon request a written permission to distribute the PDF file will be granted against payment of a permission fee depending on the number of accesses required. Please contact Karger Publishers, Basel, Switzerland at [permission@karger.ch](mailto:permission@karger.ch)

## Key Words

Cortex · Interneurons · Co-cultures · Migration · Microtubules · Nocodazole · Videomicroscopy

## Abstract

We have shown previously that actomyosin contractility plays an important role in controlling nuclear movements in future interneurons born in the medial ganglionic eminence (MGE) [Bellion et al.: *J Neurosci* 2005;25:5691–5699]. Because microtubules are known to control the structural and motile properties of migrating neurons, we asked whether alterations in the dynamic instability of microtubules would impair MGE cell migration. Migration was analyzed in flat cocultures in which green-fluorescent-protein-expressing MGE cells migrate on cortical cells from their explant of origin. A low (100 nM) concentration of nocodazole shortened the leading process of MGE cells that nevertheless continued to migrate at the same rate but frequently changed their direction of migration relative to control cells. MGE cells treated with a higher (1  $\mu$ M) concentration of nocodazole that strongly destabilized microtubules took on multipolar morphology. They extended thin and labile processes. MGE cells no longer exhibited directional migration and migration velocity slowed 2-fold. These results suggest that microtubule stability is crucial for

maintaining polarity and controlling the directional migration of MGE cells, whereas additional mechanisms are required to control cell motility. Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

## Introduction

Most cortical neurons present successively different types of migratory movement during development. The radial glia-guided mode of migration is adopted by future efferent pyramidal neurons migrating to their final layer in the cortical plate after earlier phases of multipolar, tangential or ventricle-directed migration [1–3]. Future inhibitory interneurons, which predominantly migrate tangentially, adopt a radial mode of migration to target their appropriate cortical layer at the end of their journey [4]. Moreover, cells exhibiting different modes of migration differ in morphology and migration speed. Neurons migrating tightly associated with radial glial cells show bipolar elongated morphologies and limited changes in shape as they glide along glial fiber [5–7]. Their migration is slow, with a mean speed ranging between 9 and 35  $\mu$ m per hour, depending on the experimental conditions [1, 8, 9]. Tangentially migrating neurons and multipolar cells on the other hand do not associate with radial glia.

## KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail [karger@karger.ch](mailto:karger@karger.ch)  
[www.karger.com](http://www.karger.com)

© 2008 S. Karger AG, Basel  
0378–5866/08/0303–0132\$24.50/0

Accessible online at:  
[www.karger.com/dne](http://www.karger.com/dne)

Christine Métin  
INSERM U839, Hôpital Pitié-Salpêtrière  
47 Boulevard de l'Hôpital  
FR–75651 Paris Cédex 13 (France)  
Tel. +33 1 4216 2672, Fax +33 1 4570 9990, E-Mail [metin@chups.jussieu.fr](mailto:metin@chups.jussieu.fr)

Tangentially migrating neurons are polarized cells that continuously eliminate and renew branches at their leading edge during migration. They move quite quickly, with a migration speed ranging between 20 and 55  $\mu\text{m}$  per hour [4, 10, 11]. In contrast, multipolar cortical cells do not maintain a clearly polarized morphology during migration, they extend numerous and highly motile processes and show a very slow migration rate, of 1.6–6  $\mu\text{m}$  per hour [1, 2].

Microtubules are determinant in controlling cell shape and motility. Microtubule-associated proteins such as LIS1, DCX, Tau or Map1B play a complex role in organizing microtubules and controlling cell and axonal migration [12–17]. Mutations in these proteins induce major disorders in the human cortical organization [18–20]. Analyses at the cellular level suggest that DCX and LIS1 both control process outgrowth and nuclear movements. Dynamic studies of tangentially migrating neurons knockout for *Doublecortin* show increased branching activity at the leading edge and abnormal nucleus-centrosome coupling [21, 22]. *Doublecortin* silencing by RNAi in radially migrating cortical neurons resulted in a multipolar phenotype for neurons that then accumulated in the intermediate zone [23, 24], a cortical zone where multipolar neurons are normally observed [1, 2]. LIS1, which interacts with the microtubule-associated motor protein dynein, functions in the developing cortex to control tangential migration and somal translocation in radially migrating neurons [25, 26]. Moreover, it controls the transition between the multipolar and bipolar migratory stages [26].

In the present study, we used nocodazole at concentrations that moderately or strongly depolymerized microtubules in order to further examine how microtubule dynamics influence the morphology and dynamic properties of tangentially migrating cortical neurons. Nocodazole was applied to future interneurons derived from the medial ganglionic eminence (MGE) in the basal forebrain [for review, see 27] and the changes in morphology and migratory behavior induced by the drug were quantified. At nanomolar concentrations, nocodazole did not change the migration speed of MGE cells but significantly altered their directionality. Nocodazole induced marked changes in MGE cell morphology leading to cells that no longer maintained a fixed polarity and presented a significant decrease in migration speed. At micromolar concentration, nocodazole significantly reduced the migration speed of MGE cells in addition to strong alterations in polarity and in the persistence of direction of migration.

## Methods

### Animals

Wild-type mouse embryos and mouse embryos ubiquitously expressing green fluorescent protein (GFP) were produced in the laboratory from crosses between Swiss females and males (Janvier, France) or Swiss females and GFP transgenic males (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me., USA). The day of the vaginal plug was counted as embryonic day 0.5 (E0.5). Pregnant females were killed by cervical dislocation to collect embryos that were dissected in cold Leibovitz medium (L15; Invitrogen, San Diego, Calif., USA).

### Cultures

Cocultures were performed on polylysine/laminin-coated glass coverslips either placed on the bottom of culture wells or fixed with paraffin/Vaseline mixture to the bottom of perforated Petri dishes to image migrating MGE cells. MGE explants from E13.5 GFP-expressing embryos were deposited either on a monolayer of wild-type dissociated cortical cells or on cortical axons extending from wild-type cortical explants as explained previously [11]. Cells were mechanically dissociated by pipeting cortical tissue in DMEM/F12 medium containing 20% fetal calf serum (Invitrogen). MGE explants dissected in the rostral MGE [28] were divided into 6 smaller cubes (200  $\mu\text{m}$  each side) deposited on the same coverslip. On dissociated cells, they were placed 1 mm apart from each other on average. Cocultures were maintained in DMEM/F12 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 33 mM D-glucose, 3 mM sodium bicarbonate, 10 mM HEPES buffer, pH 7.4, 10 IU/ml penicillin/streptomycin, and 10% N2 and B27 complement (all from Invitrogen) in a humidified incubator with 5%  $\text{CO}_2$  at 37°C for 1 day before imaging GFP-expressing MGE cells.

### Videomicroscopy

Before imaging, the culture medium was replaced with HEPES-buffered MEM, which was phenol red free as explained in Bellion et al. [11]. Pictures were acquired with an inverted epifluorescence microscope (Axiovert; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a monochromator, a motorized stage, a piezo z objective, a humidified and thermo-regulated chamber and a cooled CCD camera (Orca; Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan). Exposure time (500–800 ms) was controlled by the monochromator. GFP-expressing MGE cells were imaged through a 20 $\times$  (Plan-Apochromat) objective every 3 or 5 min. Image acquisition was performed using MetaMorph software (Universal Imaging Corporation, West Chester, Pa., USA). Analyses were done with MetaMorph and ImageJ (NIH Image; National Institutes of Health, Bethesda, Md., USA) software.

### Pharmacological Treatment

Cocultures destined to morphological analyses were cultured for 1 day in vitro. Then half of the medium (250  $\mu\text{l}$ ) was removed from culture wells and replaced by the same volume of either control medium or 2 $\times$  nocodazole-containing medium (Sigma). Control and treated cocultures were fixed 6 h later. Cocultures destined to videomicroscopy experiments were imaged for 2–4 h before pharmacological treatment. Video culture medium (see above) was replaced by culture medium containing the nocodazole at the final concentration. Mechanical stability of preparations during culture medium replacement was controlled



under camera surveillance. After drug application, cocultures were recorded from 6 to 12 h, depending on the experiments. In some experiments, nocodazole was washed out by rinsing cocultures more than 10 times with control culture medium.

#### Immunocytochemistry

Cocultures were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.12 M phosphate buffer (platelet-activating factor)/0.33 M sucrose at 4°C or in platelet-activating factor 0.33 M sucrose at 4°C for 2 min and in -20°C methanol for 10 min for tubulin immunostaining. The GFP was visualized using a rabbit serum (1:1,000; Molecular Probes, Eugene, Oreg., USA) or mouse IgG (AFP 3E6, 1/100, Q-Biogene, Irvine, Calif., USA). The tyrosinated tubulin was visualized using rat IgG (YL1/2, 1/1,000, Abcam, Cambridge, UK) and the detyrosinated tubulin using rabbit serum (L4, 1/1,000, generous gift from Drs. A. Andrieux and D. Job, CEA, Grenoble, France), Alexa-488- or Cy3-coupled secondary antibodies (1:400; Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pa., USA) were diluted in PBS/2% NGS/0.2% Triton X-100.

#### Analysis and Quantification

To compare the morphology of MGE cells in control cocultures and in the presence of nocodazole, neuritic arbor branches were numbered as explained in figure 1 and their length measured using Neuron J (NIH Image) software. Cells were classified into 4 categories according to the structure of their neuritic arbor as previously described [22] and the percentage of cells in each class in various culture conditions calculated. Nuclear movements were tracked using Metamorph software. Migration speed was calculated over a 2-hour period before drug application. To avoid perturbations due to medium change, the mean speed of migration in the presence of nocodazole was calculated for a 2-hour period starting 1 h after the beginning of the nocodazole application (see table 1). The statistical significance of the results was assessed by a  $\chi^2$  test when the results were expressed as category frequencies (morphological classes and angular deviation) and by a t test when the results were expressed as mean values (neurite length, nuclear speed, frequencies of polarity reversal, persistence in directionality).

**Fig. 1.** Neuritic arbors of MGE cells are simplified and shortened in the presence of low nocodazole concentrations and disorganized in the presence of higher nocodazole concentrations. **A** Classification of migrating MGE cells according to increasing complexity of the neuritic arbor (modified from Kappeler et al. [22]). Type A MGE cells (left side of photomontage) show an unbranched leading process ahead of the nucleus and a trailing process at the rear. Type B MGE cells (center of photomontage) show leading processes with 1 bifurcation, type C MGE cells (right side of photomontage) 2 successive bifurcations and type D cells 3 successive bifurcations. Neuritic branches are numbered (I, II, ...) with regard to their location between the nucleus and successive bifurcations. n = Nucleus. **B** Photomicrographs illustrate the typical morphology of MGE cells cultured on dissociated cortical cells and exposed to increasing concentrations of nocodazole. MGE cells treated with 20 and 100 nM nocodazole show shorter leading arbors with structures similar to leading neurites in control (CTL) cultures (0 nM, left panel). MGE cells treated with 1  $\mu$ M

## Results

GFP-expressing MGE cells migrating on a flat monolayer of dissociated cortical cells or on cortical axons surrounding a cortical explant were exposed to nocodazole at concentrations ranging from 7.5 nM to 1  $\mu$ M.

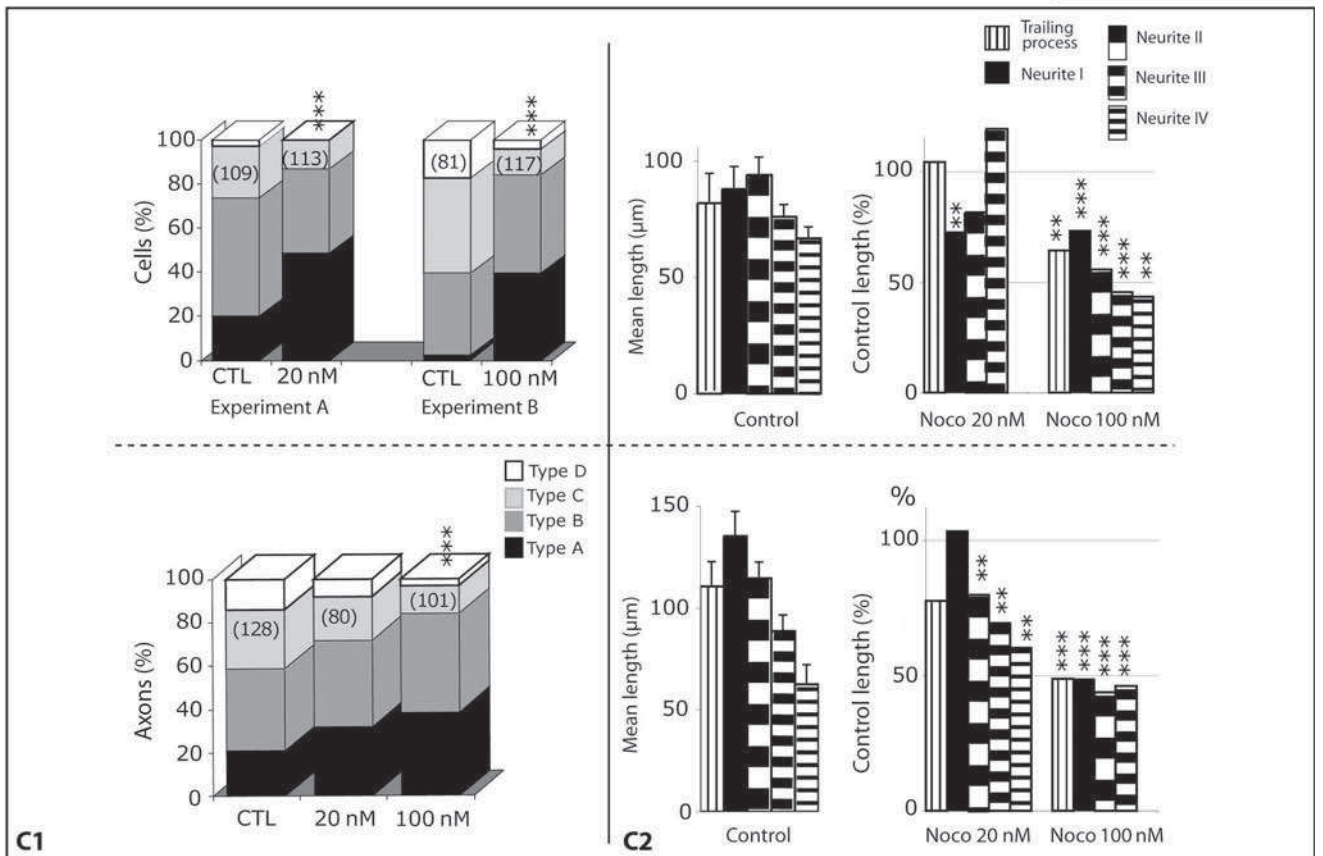
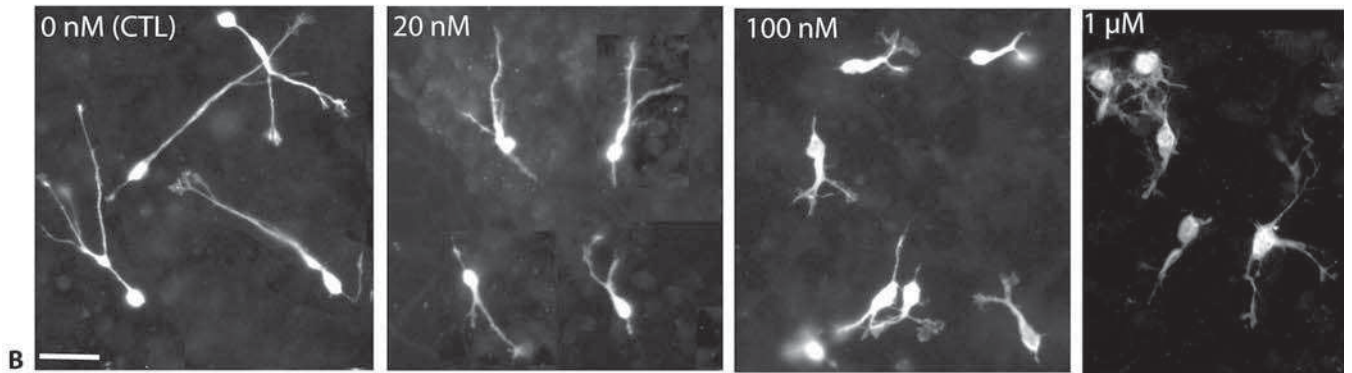
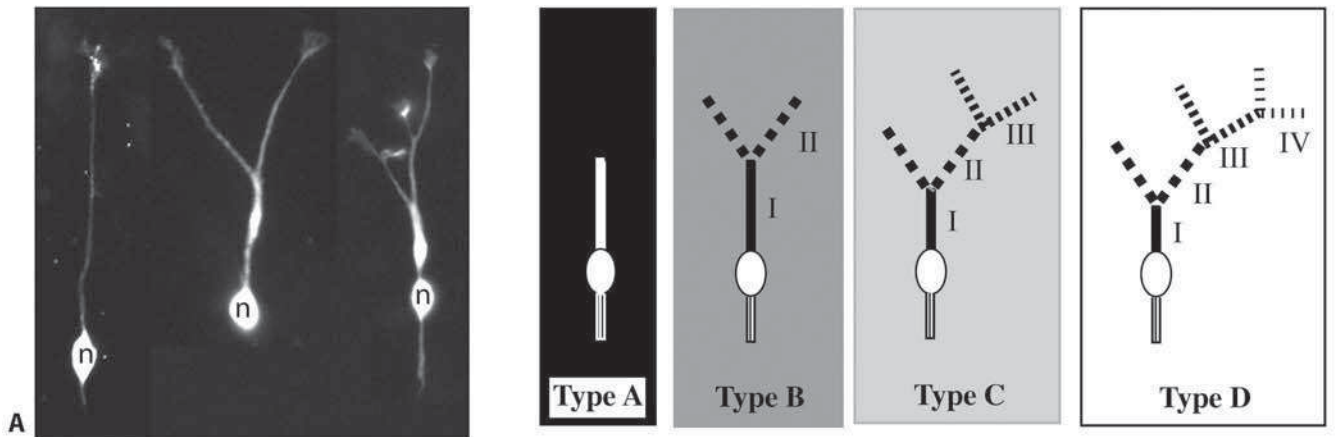
#### *Depending on the Concentration, Nocodazole Either Shortened or Disorganized Neuritic Processes*

Nocodazole concentrations below 20 nM did not induce obvious morphological changes in MGE cells. As previously described [11], MGE cells in control cocultures exhibited a characteristic bipolar morphology with a branched neuritic arbor at their leading side and a large swelling enclosing the nucleus at the rear (fig. 1A). A trailing process varying in length and morphology was observed behind the nucleus. The neuritic arbor of MGE cells results from successive divisions of the leading growth cone and most MGE cells present a bifurcated leading neurite. Accordingly, the proportion of cells with an unbranched leading process in cocultures was less than 20%, whereas cells with 1 or 2 successive bifurcations represented 65–80% of the whole population (see control histograms in fig. 1C1). In addition, our quantitative study revealed a clear influence of the substratum on the morphology of migrating MGE cells. MGE cells migrating on cortical axons extended longer neurites than MGE cells migrating on dissociated cortical cells (see mean length in control histograms, fig. 1C2).

MGE cells exposed to nocodazole for 6–7 h at concentrations ranging from 20 nM to 100 nM displayed a brushy aspect due to the presence of thin and short expansions

nocodazole extend a number of thin more or less branched processes around the cell body. Scale bar: 20  $\mu$ m. **C1** Histograms give the percentages of MGE cells with type A, B, C and D neuritic arbors in 3 independent experiments (figures in parentheses are numbers of cells). Cultures were performed on dissociated cortical cells (upper left, 2 experiments) or cortical axons (bottom left) and treated with 20 and 100 nM nocodazole. The frequency of MGE cells with simple (types A and B) neuritic arbors increases proportionally with the nocodazole concentration. The statistical significance of differences in distribution was tested with a  $\chi^2$  test (\*\*\*)  $p < 0.001$ . **C2** Histograms show the mean length of type I, II, III and IV neuritic branches in the same experiments as **C1**. Nocodazole (Noco) at 100 nM induced a 2-fold decrease in the length of all neuritic branches. A minor and variable decrease in length was observed with nocodazole at 20 nM. The differences in length between control and nocodazole-treated cells were tested by a t test (\*\*\*)  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ ).





**Table 1.** Mean migration speed variation in MGE cells treated with nocodazole

Nocodazole concentration nM	Cells	Mean migration speed (2 h)		p value
		prior to drug application $\mu\text{m/h}$	mean percentage of change (1–3 h after drug application)	
15	36	55 $\pm$ 2.3	3	
15	28	51 $\pm$ 2.5	–8	
20	18	59 $\pm$ 3.2	–9.2	NS
20	23	27 $\pm$ 1.5	12	NS
20	32	63 $\pm$ 2.8	–7.1	NS
75	79	41 $\pm$ 2.3	–7	NS
75	52	36 $\pm$ 2.7	–14.5	NS
100	23	43 $\pm$ 2.5	–5	NS
100*	81	42 $\pm$ 1.5	–24.7	p < 0.001
100	37	34 $\pm$ 1.5	7	NS
1,000	13	30 $\pm$ 1.3	–44	p < 0.001
1,000	13	58 $\pm$ 3	–47	p < 0.001
1,000	20	47 $\pm$ 2.1	–57	p < 0.001
1,000	37	45 $\pm$ 2.9	–29	p < 0.001

Table 1 shows the mean migration speed of large populations of MGE cells prior to and after nocodazole treatment, in several independent experiments. The mean migration speed of nocodazole-treated MGE cells is expressed as a percentage change of the mean migration speed of the same population in the control period. No significant changes (NS, t test,  $p \geq 0.05$ ) were recorded in cultures exposed to concentrations inferior to 100 nM, except in 1 case (\*), where MGE cells in fact showed important morphological alterations. Highly significant diminutions in mean speed (t test,  $p < 0.001$ ) were recorded in cultures treated with nocodazole at 1  $\mu\text{M}$ . Instantaneous migration speed of individual cells was recorded during a 2-hour period, prior to and 1 h after drug application. Comparison between experiments shows an important variability in control values (from 27 to 63  $\mu\text{m}$  per hour). The lowest migration speeds were observed in cultures maintained for 2 days in vitro before imaging cells (italics).

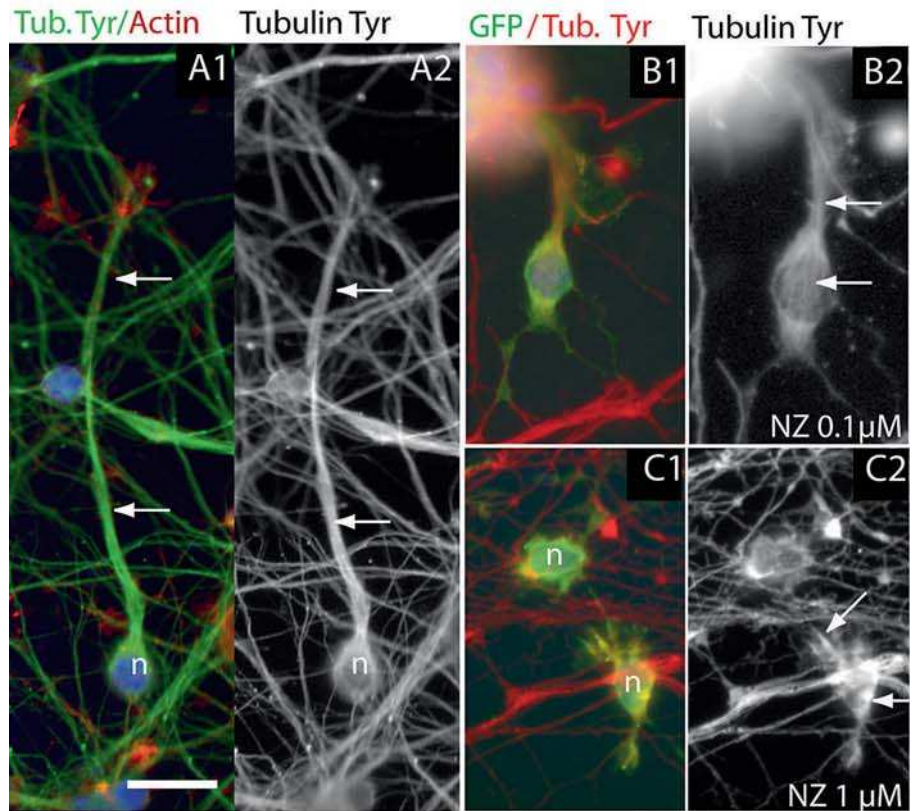
all along their neurites. Cells still showed a polarized morphology, although neuritic arbors were shortened and less bifurcated (fig. 1B). Growth cones often exhibited complex shapes with numerous filopodia. The proportion of MGE cells with 1 unbranched leading process (type A, see fig. 1A) increased, whereas the proportion of MGE cells with 2 or more bifurcations in their leading process (types C or D) significantly decreased (fig. 1C1). Changes in proportions increased with growing nocodazole concentration. Moreover, cells treated with 100 nM nocodazole displayed a 2-fold decrease in the mean length of neuritic branches, whereas 20 nM nocodazole had milder and more variable effects on neurite length (fig. 1C2). Interestingly, nocodazole applied at 1  $\mu\text{M}$  had distinct and more profound effects on MGE cell morphology. After several hours in culture, most MGE cells had lost their characteristic bipolar morphology. They extended several thin, often branched processes among

which no leading process could be identified (fig. 1B). As a consequence, MGE cells could no longer be classified according to criteria defined in figure 1A.

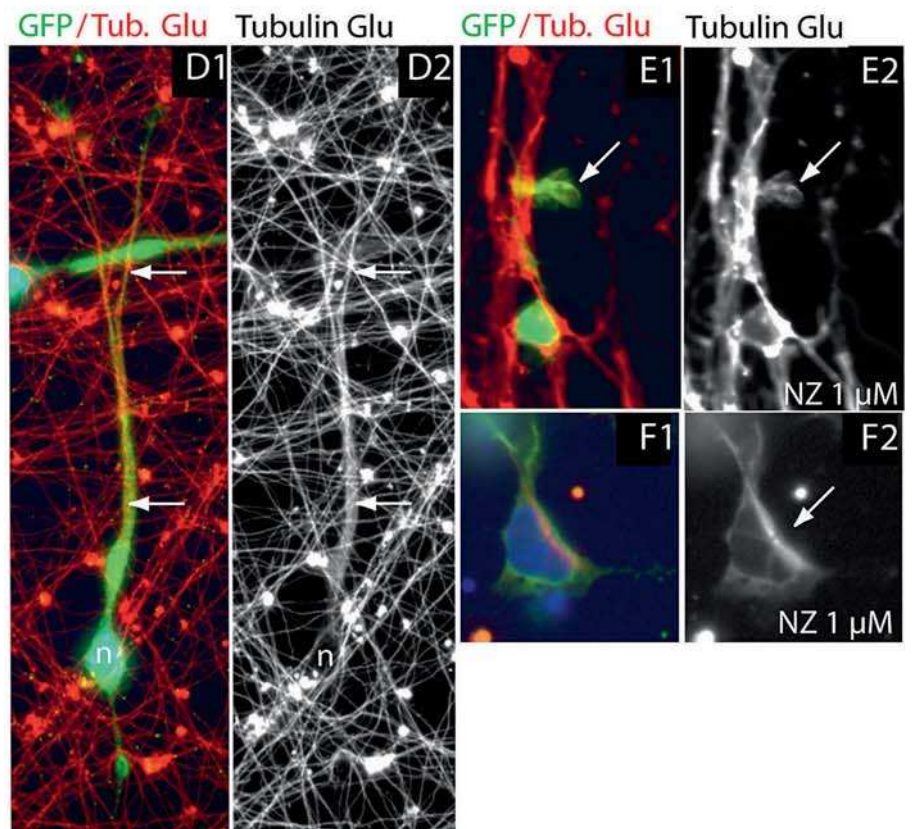
Together, these results show that low concentrations of nocodazole induced a shortening and simplification of the neuritic arbor in migrating MGE cells without strongly modifying the structure of the neuritic arbor. In contrast, high concentrations of nocodazole induced a profound disorganization of MGE cell processes.

We then analyzed the changes in the organization of the microtubule network with antibodies that stain tyrosinated tubulin and reveal dynamic microtubules, and with antibodies that stain detyrosinated tubulin and reveal microtubules with a slow subunit turnover (the so-called ‘stable’ microtubules).

In MGE cells migrating on cortical axons, dynamic microtubules formed a dense and continuous network in the cell body and in neuritic processes (fig. 2A1, A2). Anti-



**Fig. 2.** Immunostaining of tyrosinated (**A1–C2**) and detyrosinated (**D1–F2**) tubulin in control (**A, D**) and nocodazole-treated (**B, C, E, F**) MGE cells expressing the GFP. Black and white panels (**A2, B2, C2, D2, E2, F2**) show tubulin immunostaining. Except **A1**, 3 color panels show GFP in green, tubulin in red and nuclei in blue. **A1, A2** MGE cells migrating on cortical axons show a dense network of microtubules immunopositive for tyrosinated tubulin in the perinuclear compartment and in the leading neurite (white arrows). **B1, B2** In the presence of nocodazole (NZ) 0.1  $\mu\text{M}$ , long tyrosinated positive microtubules are still present in the leading process and in the nuclear compartment (arrows). **C1, C2** In MGE cells treated with nocodazole 1  $\mu\text{M}$ , long microtubules are no longer visible and replaced by local aggregates of tyrosinated tubulin (arrows). **D1, D2** Antibodies to detyrosinated tubulin label processes at the leading side (white arrows) of an MGE cell migrating on cortical axons. **E1–F2** In MGE cells treated with nocodazole 1  $\mu\text{M}$  that extend short processes, short microtubules positive for detyrosinated tubulin are located at the extremities of processes (white arrow in **E1, E2**) or form an aster in the perinuclear compartment (white arrow in **F1, F2**). Scale bar: 10  $\mu\text{m}$  (**A1, A2, B1, C1–E2**); 7  $\mu\text{m}$  (**B2, F1, F2**). n = Nucleus.





bodies to detyrosinated tubulin stained a dense array of stable microtubules that strongly resembled the network of dynamic microtubules (fig. 2D1, D2). In a proportion of MGE cells, stable microtubules were more faintly labeled in the cell body than in leading processes, showing moderate changes in localization during migration. MGE cells treated with 100 nM nocodazole exhibited shortened leading processes with a high density of microtubules oriented parallel to the axis of migration (fig. 2B1, B2). In contrast, MGE cells treated with 1  $\mu$ M nocodazole showed small aggregates of tyrosinated tubulin in the cell body and short tyrosinated-tubulin-positive structures in the processes (fig. 2C1, C2). In these cells, antibodies to detyrosinated tubulin labeled a few short microtubules at the extremities of the processes (fig. 2E1, E2) and small asters of microtubules in some cell bodies (fig. 2F1, F2). All together, these observations show very similar distributions of stable and dynamic microtubules in MGE cells. The nocodazole concentration that efficiently depolymerized microtubules in MGE cells was in the micromolar range, in spite of the presence of residual microtubules in leading processes and occasionally in the perinuclear compartment.

#### *Nanomolar Concentrations of Nocodazole Do Not Impair MGE Cell Motility*

In contrast with previous observations showing that nanomolar concentrations of nocodazole significantly decreased the cell motility of fibroblasts [29] and the dynamic turnover of microtubules in vitro [30], in our cocultures low concentrations of nocodazole did not impair the motility of MGE cells. Indeed, cells exhibited the same mean migration speed prior to and after nocodazole application in several independent experiments and for

various nocodazole concentrations in the nanomolar range (see summary in table 1).

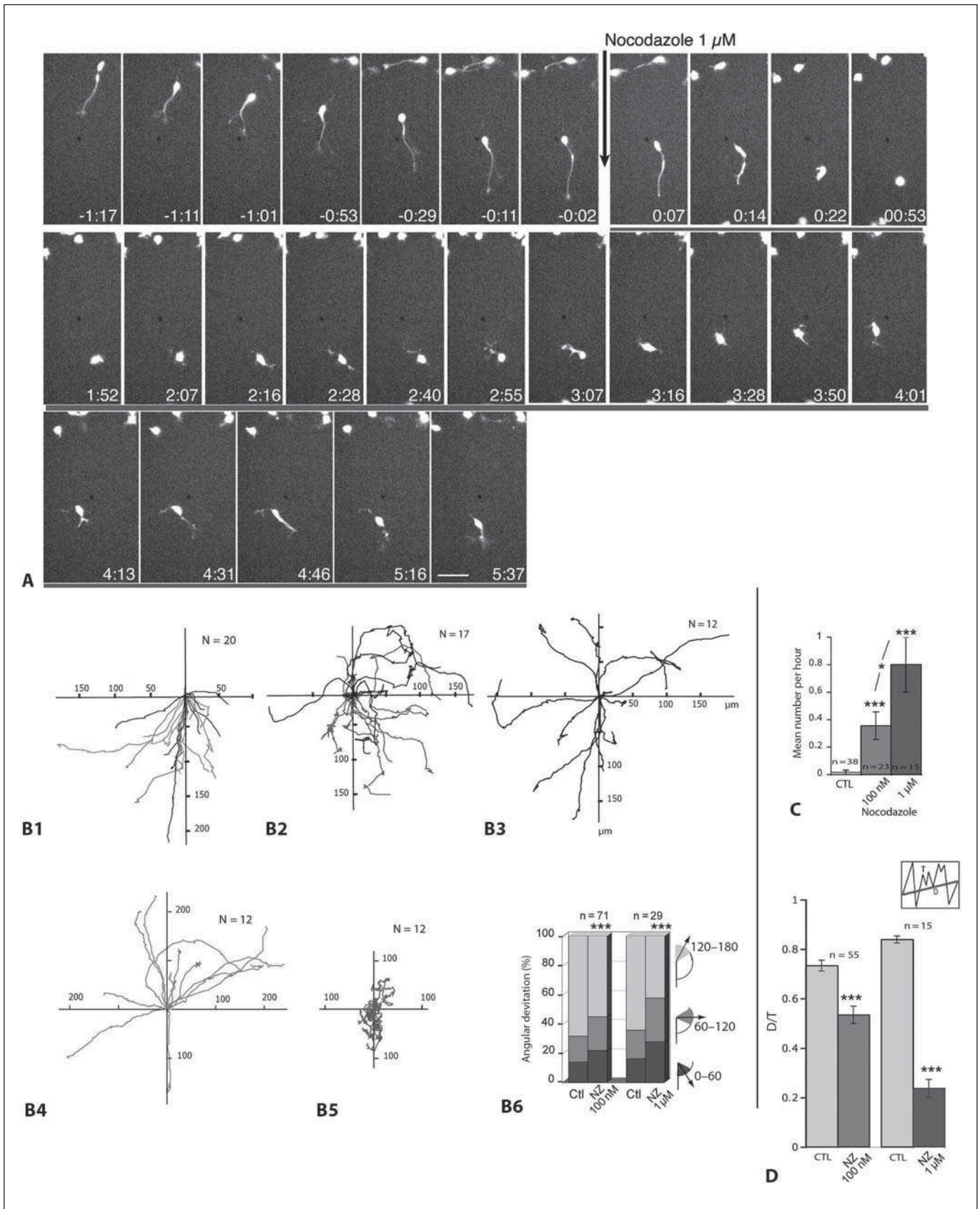
MGE cells displayed large variations in mean migration speed (from 27 to 63  $\mu$ m per hour, table 1). Lower values were recorded in cultures maintained for 2 days. Within the same culture, large variations in mean speed were observed between cells migrating either close to each other or at a distance. Accordingly, speed variations less than 15% in nocodazole-treated cocultures never reached statistical significance by t test, in spite of the large size of samples (see table 1). Except in 1 experiment, nocodazole concentrations (75 and 100 nM) that induced a simplification of the neuritic arbor morphology and a 50% decrease in neuritic length did not significantly decrease the migration speed of MGE cells (see table 1). In contrast, micromolar concentrations of nocodazole triggered a significant decrease (ranging from 30 to 60%, see online suppl. video of fig. 3,) [www.karger.com/doi/10.1159/000109858](http://www.karger.com/doi/10.1159/000109858) in the mean migration speed.

#### *Nocodazole Altered the Directionality of Migrating MGE Cells*

MGE cells migrating on dissociated cortical cells exhibit a stereotypical migratory behavior [11, 22, 27]. Nuclear movements alternate with leading process elongation. In these cells, the nucleus exhibits a saltatory progression along a path determined by neuritic branches successively added at the leading edge. Reversal of nuclear movement polarity is rare. Thus, MGE cell nuclei follow fairly straight trajectories with limited directional changes occurring at points corresponding to neuritic bifurcations (illustrated and quantified in fig. 3B1, B4, B6 and schematized in fig. 4C).

**Fig. 3.** Directional migration is strongly affected by nocodazole treatment. **A** The time-lapse sequence corresponding to the movie (online suppl. video) shows an MGE cell migrating on dissociated cortical cells prior to and after (grey line below frames) 1  $\mu$ M nocodazole application. The time 00:00 (hours:minutes) corresponds to the nocodazole application. Negative and positive elapsed time is indicated at the bottom of the frames. During the control period, the nucleus migrates from top to bottom within the neuritic arbor growing in front of the cell. The leading neurite splits 3 times (frames -1:11, -0:53, -0:11). 1  $\mu$ M nocodazole induces leading neurite and tail retraction. Thereafter, the MGE cell re-extends thin, branched and unstable neurites, sometimes at 2 opposite poles of the cell body, in which the nucleus moves short distances. Scale bar: 20  $\mu$ m. **B** Traces show the nuclear trajectories (in micrometers) of MGE cells in control cocultures (**B1**, **B4**), in cultures with 100 nM (**B2**) or 1  $\mu$ M (**B5**) nocodazole and after nocodazole washout (**B3**). The number of traces is indicated in the upper right

corner. Cells tracked both during the control (CTL) period and after nocodazole (NZ) application are shown in grey. Angular deviations of trajectories were grouped into 3 classes (**B6**) and the frequencies of turns in each class prior to and after nocodazole application were compared in n cells. Nocodazole at 100 nM and 1  $\mu$ M significantly increased the frequency of sharp angular deviations (<60° and >60°, >120°). Changes increased with nocodazole concentration. The statistical significance of changes in distribution was tested by a  $\chi^2$  test (\*\*\*)  $p < 0.001$ ). **C**, **D** Histograms compare the frequency of nuclear polarity reversals (**C**) and the persistence of direction (D/T ratio as illustrated in the schema, where D is the shortest distance and T is the trajectory length) prior to and after nocodazole application in n cells during 2-hour periods. Changes in polarity were extremely rare in control cocultures and became frequent in nocodazole-treated cocultures. Migration directionality was lost in the presence of nocodazole at 1  $\mu$ M. Statistical significance was tested with a t test (\*\*\*)  $p < 0.001$ .



We also analyzed the trajectories of MGE cells exposed to nocodazole at 100 nM and 1  $\mu$ M. As illustrated in figure 3A and in the movie of figure 3, after an initial phase of neuritic collapse lasting from half an hour to 1 h, MGE cells exposed to 1  $\mu$ M nocodazole re-extended short processes and resumed their migration by translocating the nucleus within new unstable processes. Cells no longer maintained the same polarity and frequently reversed their nuclear movements (fig. 3C). Sharp turns in nuclear trajectories were common (fig. 3B5, B6), and persistence in the same direction was diminished (fig. 3D).

MGE cells exposed to 100 nM nocodazole exhibited similar, although less profound, alterations in nuclear trajectories (fig. 3B2). In contrast to MGE cells exposed to 1  $\mu$ M nocodazole, these cells were able to maintain a polarized morphology with a short leading neurite in front of the nucleus for longer periods of time. Accordingly, nuclear movements exhibited a better directional persistence than in MGE cells exposed to 1  $\mu$ M nocodazole (fig. 3D). Polarity reversal and sharp or right angle turns were, nevertheless, significantly more frequent than in control cocultures (fig. 3B6, C). Such dramatic alterations in nuclear trajectories disappeared after nocodazole washout and leading neurite regrowth (fig. 3B3).

#### *Nocodazole-Treated MGE Cells Explore Smaller Areas*

Nocodazole treatments that did not change the migration speed of MGE cells nevertheless strongly impaired their leading neurite morphology and the directionality of their migratory movements. We therefore analyzed the respective influence of migration speed and directionality persistence on areas colonized by MGE cells migrating from an explant (fig. 4B).

**Fig. 4.** Changes in surface area explored by MGE cells treated with nocodazole. **A1–A5** Areas covered by GFP-expressing cells migrating on dissociated cortical cells from an MGE explant. **A1** Surface covered by MGE cells at the beginning of the experiment. **A2–A5** Surface already covered by MGE cells 8 h later in control medium (**A2**) or in the presence of 20 nM (**A3**), 100 nM (**A4**) or 1  $\mu$ M (**A5**) nocodazole. **B** Results were quantified by measuring the distance from the explant to the fifth most distant cell on 8 equidistant radii around the explant. Migration areas equivalent to the dashed square shown in **B** with radius  $r$  and  $r'$  are shown in panels **A1–A5**. **C** The histogram shows the mean radius length measured as explained above. Five explants were analyzed for each experimental condition. The same increase in migration area compared to the migration area at T0 was observed in control and 20-nM nocodazole cultures. Cultures treated with nocodazole

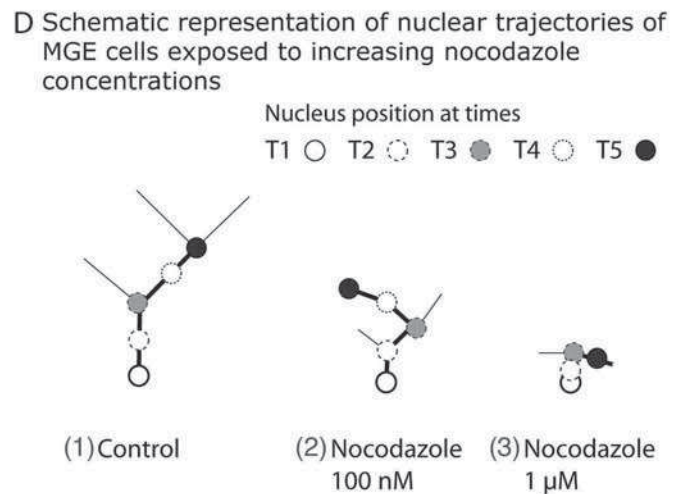
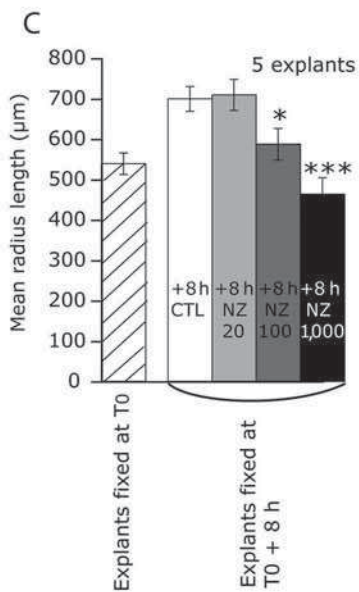
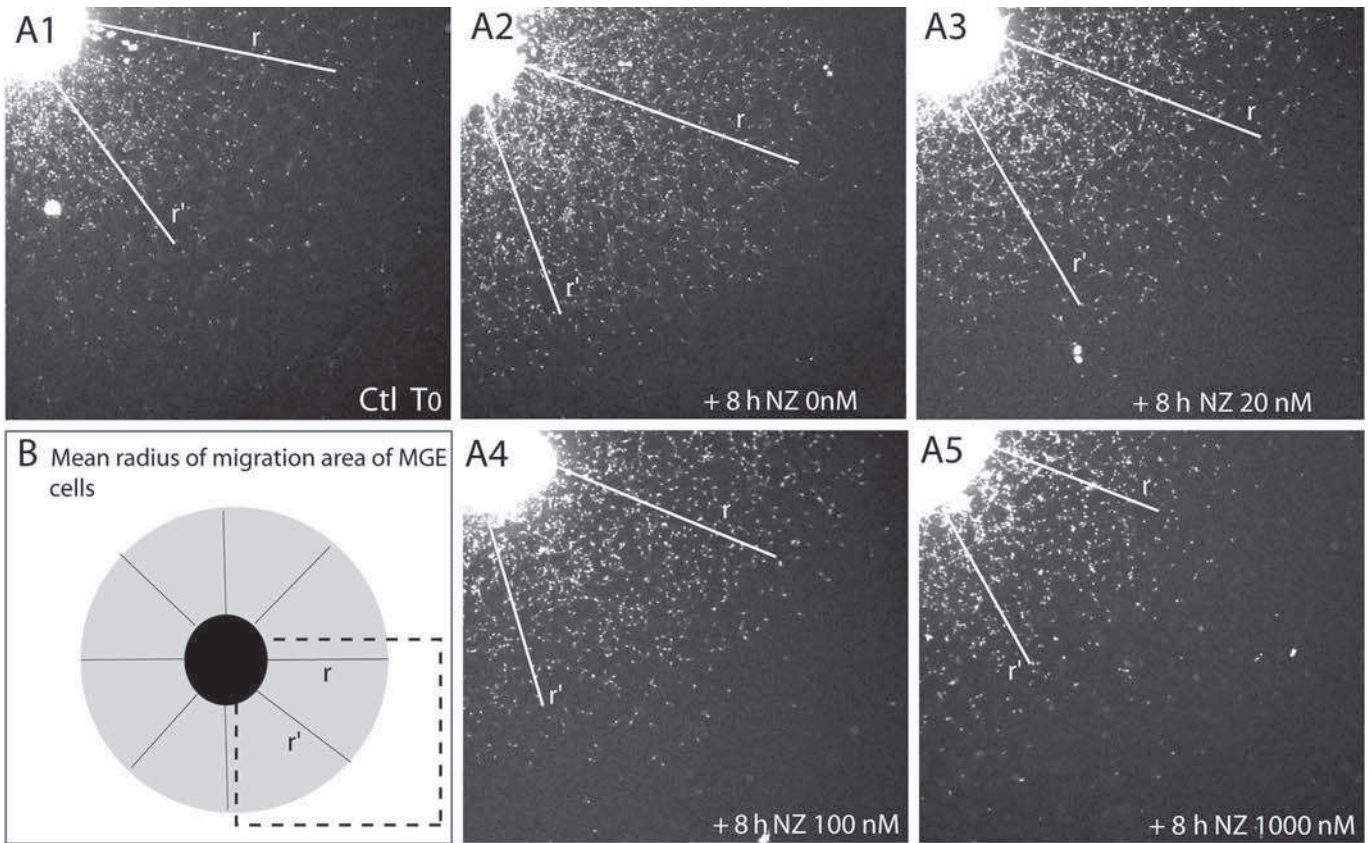
Figure 4 shows that MGE cells exposed to a nocodazole concentration (20 nM) that neither significantly altered migration speed nor neuritic length and nuclear trajectories (data not shown) colonized similarly sized areas as MGE cells in control cocultures (compare panels A3 and A2 in fig. 4). MGE cells exposed to 100 nM nocodazole that migrated as quickly as control MGE cells colonized smaller areas because of their abnormally curved trajectories (see interpretative schema in fig. 4D). Also, as expected, MGE cells exposed to nocodazole at 1  $\mu$ M that exhibited both reduced migration speed and a decreased persistence of migration directionality did not further colonize the area surrounding their explant of origin (fig. 4A5, C, D).

## Discussion

In the present study, we have analyzed the effect of nanomolar and micromolar concentrations of nocodazole on migrating cortical interneurons. Surprisingly, alterations on MGE cell morphology and migration directionality were more pronounced than changes in cell motility. (i) High nocodazole concentrations (1  $\mu$ M) induced a complete disorganization of MGE cell neurites, markedly reducing their thickness and branching pattern. Neurites emerged from several points (2 or 3) around the cell body. Accordingly, the network of microtubules exhibited a profound disorganization. Tubulin accumulated in thin processes and short stable microtubules could be observed at the extremities of these processes. Treated MGE cells were still mobile though displaying erratic locomotion. (ii) Low nocodazole concentrations (75 or 100 nM) did not alter the polarized morphology of MGE cells but did induce short-

at 100 nM showed a smaller increase in area, and cultures treated with nocodazole at 1  $\mu$ M showed no increase at all. The statistical significance of differences between control and nocodazole-treated cultures were tested with a t test (\*\*\*)  $p < 0.001$ ; \*  $p < 0.05$ ). **D** Interpretative scheme of the influence of neurite length and stability on nuclear trajectories in MGE cells. Circles correspond to nuclear positions at 5 successive time points (T1–T5). MGE cells treated with nocodazole at 100 nM (2) extend shorter neurites and therefore reorient their nucleus more frequently than control MGE cells (1). Because of the same migration speed, nuclear trajectories are similar in length and differ in rectilinearity. MGE cells exposed to nocodazole at 1  $\mu$ M develop short and unstable neurites and show reduced migration speed. Nuclear trajectories are shorter and more erratic (3).





ening and reduced branching of the leading neurite. Microtubules were reduced in length compared to the control cells. MGE cells had lost the capacity to maintain a persistent direction of migration over long distances but still migrated as actively as control MGE cells.

The different responses of MGE cells to varying nocodazole concentrations reflect a dose-dependent effect of nocodazole on microtubule length. Nocodazole at nanomolar concentrations slows the velocity of microtubule elongation and shortening in cell lines and in vitro preparations of microtubules, whereas nocodazole at micromolar concentrations induces microtubule depolymerization [29–32]. In MGE cells, low concentrations of nocodazole reduce the length of microtubules and micromolar concentrations strongly depolymerize microtubules. Surprisingly, low nocodazole does not phenocopy *Doublecortin* inactivation which is predicted to decrease microtubule stability [14, 15]. *Doublecortin* knockout MGE cells developed neuritic arbors with more secondary and tertiary branches than control MGE cells [22], whereas nocodazole-treated MGE cells showed shortened and poorly bifurcated leading neurites. MGE cells treated with nanomolar concentrations of nocodazole displayed shortened processes decorated by numerous membrane protrusions, which should result from moderate microtubule destabilization or from microtubule reorganization. Nocodazole concentrations that depolymerize microtubules induced in MGE cells a complete disorganization of neuritic processes whose morphology strongly differed from processes in *Doublecortin* knockout MGE cells.

Nocodazole at 1  $\mu\text{M}$  markedly altered the morphology of MGE cells but did not completely inhibit their motility. Moreover, nocodazole concentrations known to reduce the motility of fibroblasts to over 60% did not significantly affect the migration of MGE cells [29, 32]. MGE cells respond to nocodazole similarly to tangentially migrating neurons born in the subventricular zone, whose motility is still observed in the presence of nanomolar or micromolar concentrations of nocodazole [33]. In subventricular zone cells as in MGE cells, actomyosin contractility is important to control nuclear movements [11, 33]. Since nocodazole concentrations which depolymerize microtubules have been shown to activate Rho [34] and to stimulate actomyosin contractility [35], nocodazole-induced microtubule depolymerization in tangentially migrating neurons might activate actin-dependent forces driving cell motility.

In migrating cells, microtubules do however control cell polarity and are required for directed migration. In

leukocytes, the breakdown of microtubules is associated with random locomotion [36]. Accordingly, the directed locomotion in amoeba requires microtubule stabilization in pseudopodia and microtubule-disrupting drugs inhibit chemotaxis in these cells [37]. MGE cells exposed to nocodazole concentrations that depolymerize microtubules no longer maintained a fixed cell polarity. They dynamically extend and retract processes in various directions. Their new morphological and migration properties resembled those of multipolar cells recently described in the intermediate zone of the embryonic cortex [1]. This suggests that a drastic change in microtubule stability could determine a switch between 2 modes of migration in the same cells. It would thus be interesting to determine whether the transition between locomotion and multipolar migration of radially migrating cortical cells is triggered and/or controlled by local cues targeting microtubule stability. Accordingly, radially migrating cortical neurons with RNAi-induced DCX depletion have been shown to take on a multipolar morphology and to lose their capacity to switch to a bipolar morphology that likely requires microtubule stability [23, 24]. In our cocultures, MGE cells with impaired polarity no longer efficiently colonized the area surrounding their territory of origin. This defect might directly result from either inability to maintain a straight direction of migration because of a shortened neuritic arborization and inconsistent polarity, or from abnormal responses to guidance cues present in the environment. Examination of these possibilities in physiological contexts should further elucidate the complex role of microtubule dynamics and function on MGE cell migration.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the Fondation pour la Recherche sur le Cerveau and from the Fondation J. Lejeune to C.M. The authors are grateful to Fiona Francis and Vincent Setola for the critical reading of the manuscript and members of INSERM U616 for the stimulating discussions.

## References

- 1 Tabata H, Nakajima K: Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 2003;23:9996–10001.
- 2 Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR: Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 2004;7:136–144.

- 3 Kriegstein AR, Noctor SC: Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci* 2004;27:392–399.
- 4 Nadarajah B, Alifragis P, Wong RO, Parnavelas JG: Ventricle-directed migration in the developing cerebral cortex. *Nat Neurosci* 2002;5:218–224.
- 5 Rakic P: Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* 1972;145:61–83.
- 6 Anton ES, Kreidberg JA, Rakic P: Distinct functions of alpha3 and alpha(v) integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. *Neuron* 1999;22:277–289.
- 7 Hatten ME: Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 1999;22:511–539.
- 8 O'Rourke NA, Dailey ME, Smith SJ, McConnell SK: Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science* 1992;258:299–302.
- 9 Nadarajah B, Parnavelas JG: Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 2002;3:423–432.
- 10 Polleux F, Whitford KL, Dijkhuizen PA, Vitalis T, Ghosh A: Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development* 2002;129:3147–3160.
- 11 Bellion A, Baudoin JP, Alvarez C, Bornens M, Metin C: Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J Neurosci* 2005;25:5691–5699.
- 12 Sapir T, Elbaum M, Reiner O: Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *EMBO J* 1997;16:6977–6984.
- 13 Morris SM, Albrecht U, Reiner O, Eichele G, Yu-Lee LY: The lissencephaly gene product Lis1, a protein involved in neuronal migration, interacts with a nuclear movement protein, NudC. *Curr Biol* 1998;8:603–606.
- 14 Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, Friocourt G, McDonnell N, Reiner O, Kahn A, McConnell SK, Berwald-Netter Y, Denoulet P, Chelly J: Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* 1999;23:247–256.
- 15 Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA: Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 1999;23:257–271.
- 16 Takei Y, Teng J, Harada A, Hirokawa N: Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *J Cell Biol* 2000;150:989–1000.
- 17 Teng J, Takei Y, Harada A, Nakata T, Chen J, Hirokawa N: Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization. *J Cell Biol* 2001;155:65–76.
- 18 Des Portes V, Pinard JM, Billuart P, Vinet MC, Koulakoff A, Carrie A, Gelot A, Dupuis E, Motte J, Berwald-Netter Y, Catala M, Kahn A, Beldjord C, Chelly J: A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell* 1998;92:51–61.
- 19 Gleeson JG, Allen KM, JW Fox, ED Lamperiti, Berkovic S, Scheffer I, Cooper EC, Dobyns WB, Minnerath SR, Ross ME, Walsh CA: Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* 1998;92:63–72.
- 20 Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, Wehnert M, Faustinella F, Dobyns WB, Caskey CT, Ledbetter DH: Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature* 1993;364:717–721.
- 21 Koizumi H, Higginbotham J, Poon T, Tanaka T, Brinkman BC, Gleeson JG: Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain. *Nat Neurosci* 2006;9:779–786.
- 22 Kappeler C, Saillour Y, Baudoin JP, Tuy FP, Alvarez C, Houbbron C, Gaspar P, Hamard G, Chelly J, Metin C, Francis F: Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from doublecortin knockout mice. *Hum Mol Genet* 2006;15:1387–1400.
- 23 Bai J, Ramos RL, Ackman JB, Thomas AM, Lee RV, LoTurco JJ: RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat Neurosci* 2003;6:1277–1283.
- 24 Ramos RL, Bai J, LoTurco JJ: Heterotopia formation in rat but not mouse neocortex after RNA interference knockdown of DCX. *Cereb Cortex* 2006;16:1323–1331.
- 25 McManus MF, Nasrallah IM, Pancoast MM, Wynshaw-Boris A, Golden JA: Lis1 is necessary for normal non-radial migration of inhibitory interneurons. *Am J Pathol* 2004;165:775–784.
- 26 Tsai JW, Chen Y, Kriegstein AR, Vallee RB: LIS1 RNA interference blocks neural stem cell division, morphogenesis, and motility at multiple stages. *J Cell Biol* 2005;170:935–945.
- 27 Metin C, Baudoin JP, Rakic S, Parnavelas JG: Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. *Eur J Neurosci* 2006;23:894–900.
- 28 Bellion A, Metin C: Early regionalisation of the neocortex and the medial ganglionic eminence. *Brain Res Bull* 2005;66:402–409.
- 29 Liao G, Nagasaki T, Gundersen GG: Low concentrations of nocodazole interfere with fibroblast locomotion without significantly affecting microtubule level: implications for the role of dynamic microtubules in cell locomotion. *J Cell Sci* 1995;108:3473–3483.
- 30 Vasquez RJ, Howell B, Yvon AM, Wadsworth P, Cassimeris L: Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* 1997;8:973–985.
- 31 Jordan MA, Thrower D, Wilson L: Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles: implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J Cell Sci* 1992;102:401–416.
- 32 Grigoriev IS, Chernobelskaya AA, Vorobjev IA: Nocodazole, vinblastine and taxol at low concentrations affect fibroblast locomotion and saltatory movements of organelles. *Membr Cell Biol* 1999;13:23–48.
- 33 Schaar BT, McConnell SK: Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005;102:13652–13657.
- 34 Ory S, Destaing O, Jurdic P: Microtubule dynamics differentially regulates Rho and Rac activity and triggers Rho-independent stress fiber formation in macrophage polykaryons. *Eur J Cell Biol* 2002;81:351–362.
- 35 Wittmann T, Waterman-Storer CM: Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J Cell Sci* 2001;114:3795–3803.
- 36 Keller HU, Naef A, Zimmermann A: Effects of colchicine, vinblastine and nocodazole on polarity, motility, chemotaxis and cAMP levels of human polymorphonuclear leukocytes. *Exp Cell Res* 1984;153:173–185.
- 37 Ueda M, Ogihara S: Microtubules are required in amoeba chemotaxis for preferential stabilization of appropriate pseudopods. *J Cell Sci* 1994;107:2071–2079.

© Free Author Copy - for personal use only

PLEASE NOTE THAT ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT. Upon request a written permission to distribute the PDF file will be granted against payment of a permission fee depending on the number of accesses required. Please contact Karger Publishers, Basel, Switzerland at [permission@karger.ch](mailto:permission@karger.ch)

***ARTICLE 3***

Le modèle classique de la nucléokinese des neurones en migration propose que le noyau est tiré vers l'avant de la cellule par l'intermédiaire de microtubules ancrés au centrosome.

Une question se posait alors concernant les interneurons corticaux en migration : comment ce modèle peut-il s'appliquer dans des cellules où le centrosome est localisé à grande distance du noyau, avec un lien entre celui-ci et le noyau extrêmement fin dans la phase qui précède la nucléokinese ?

Pour comprendre le rôle des microtubules dans la migration des cellules d'EGM, en particulier leur rôle dans la nucléokinese de ces cellules, une seconde question revenait sans cesse : comment les microtubules sont-ils organisés ?

Mes analyses en immunocytochimie mettaient en évidence la présence de microtubules dynamiques et stables au niveau des neurites et du soma de ces cellules, mais n'offraient pas de résultats assez précis.

Serge Marty effectuait à cette époque une étude de la morphologie synaptique par la technique de tomographie électronique (Siksou et al. 2007), qui offre une très haute résolution (de l'ordre de 5nm). Nos discussions avec Serge nous ont conduit à engager une collaboration avec Jean-Pierre Lechaire, directeur de la plate-forme d'imagerie de l'université Paris VI à Jussieu, et Thomas Boudier, maître de conférence et spécialiste de la tomographie électronique (Messaoudii et al. 2007).

Ma méthode de travail a consisté en la réalisation de coupes de microscopie électronique dans le plan de migration des cellules, puis en l'observation de ces coupes à la recherche de cellules possédant au moins un centriole, et clairement identifiables au niveau de leur phase de migration. Le balayage de centaines de grilles a ainsi permis d'isoler une trentaine de cellules qui ont été observées en tomographie électronique. Cette technique a nécessité près d'un an de mise au point, mais pour aboutir finalement à des résultats surprenants, qui ont répondu à notre question et ouvert d'autres perspectives.

En effet, les travaux que j'ai réalisés en tomographie électronique ont démontré premièrement que les microtubules des interneurons corticaux en migration sont en majorité très longs et parcourent la cellule sur une grande distance. Deuxièmement, j'ai pu observer que les microtubules centrosomiaux sont organisés de façon dissymétrique : ils sont préférentiellement dirigés vers les cônes de croissance. Troisièmement, il est apparu que dans le soma des cellules, les microtubules semblent majoritairement entourer le noyau, et seulement quelquefois contacter la membrane nucléaire. Celle-ci est capable, à certaines phases du cycle, le plus souvent lorsque le centrosome est localisé à distance du noyau, de s'étirer et de se positionner le long de faisceaux de microtubules. Enfin, cette étude a révélé de façon très surprenante, par l'observation d'une multitude de cellules en microscopie électronique conventionnelle tout d'abord, puis en tomographie par la suite, que le centrosome présente dans ces cellules des modifications ultrastructurales corrélées à des modifications de localisation intracellulaire. En effet, dans les interneurons corticaux en migration, le centriole père lorsqu'il est localisé près du noyau, est cytoplasmique et très souvent associé à une vésicule, alors que lorsqu'il est localisé à distance du noyau, il s'associe à la membrane plasmique et devient un corps basal qui fabrique un cil. Ces résultats suggèrent donc que le centriole père peut cycliquement être adressé à la membrane plasmique puis être internalisé dans le cytoplasme. Enfin, notre collaboration avec Michel Bornens de l'Institut Curie a permis de montrer que la vésicule associée au centriole mère appartient à un compartiment vésiculaire contenant la protéine Gmap210, protéine impliquée dans le maintien du Cis-Golgi autour du centrosome.



Cyclic association of the basal body to the plasma membrane in tangentially migrating MGE cells

by

Jean-Pierre Baudoin<sup>1</sup>, Chantal Alvarez<sup>1</sup>, Jean-Paul Rio<sup>1</sup>, Thomas Boudier<sup>3</sup>, Jean-Pierre Lechaire<sup>3</sup>, Michel Bornens<sup>2</sup>, and Christine Métin<sup>1§</sup>

1 Institut du fer à Moulin, INSERM UMR-S839, University Paris6, 17 rue du Fer à Moulin, 75005, Paris, France

2 Institut Curie, UMR 144 CNRS , 75248 Paris Cedex 05, France

3 IFR 83, University Paris6, Quai St Bernard, 75005, Paris, France

§ corresponding author :  
metin@chups.jussieu.fr

## ABSTRACT

In migrating neurons, the centrosome moves rostrally to the nucleus toward a swelling that differentiates in the leading process. The centrosome is considered as being coupled to the nucleus through a specific network of microtubules anchored to the centrosome, the so-called perinuclear cage. How microtubule network reorganizes in tangentially migrating cortical interneurons when centrosome moves up to 30  $\mu\text{m}$  away from the nucleus is unknown. Using electron tomography, we analyzed the three-dimensional organization of microtubules in interneurons in which the centrosome is either close to - or far away from - the nucleus. A proportion of long microtubules oriented in the migration direction were not anchored to centrioles and centrioles anchored microtubules were preferentially oriented toward the leading edge. Centrioles can thus move independently from the nucleus in migrating interneurons. Surprisingly, during the phase of nuclear centrosomal dissociation, the mother centriole translocates to the plasma membrane and associates to a short primary cilium. This primary cilium originates in a large vesicle belonging to the cis-Golgi network that assembles at the distal end of the mother centriole before membrane addressing. The mother centriole in migrating cortical interneurons is thus a basal body that cycles between the plasma membrane and the perinuclear cytoplasm in correlation to its forward migration.

## INTRODUCTION

In cells showing directed migration, the protrusive activity is confined to a small portion of cell surface, the so-called leading edge that defines cell polarity axis. The centrosome is positioned between the leading edge and the nucleus [1-3, 4, 5, 6]. Nucleus - centrosome alignment thus defines both polarity axis and migration direction of cells. In migrating neurons that extend narrow and highly polarized processes, the centrosome is most often - though not systematically - localized in front of the nucleus, near or within the leading neurite. Because of this close association, it was hypothesized that the centrosome pulls the nucleus forward in the leading process [6, 7].

Recent studies investigating centrosomal and nuclear movements in migrating neurons are changing our understanding of centrosome - nucleus coupling in migrating neurons. After princeps studies suggesting that the nucleus and centrosome are physically linked and move together [8, 9], time-lapse studies revealed that the nucleus and centrosome move alternatively in neurons migrating along radial glia processes [10]. Large nucleus centrosome dissociations, up to 30  $\mu\text{m}$ , were then observed in tangentially migrating embryonic cortical interneurons and in postnatal SVZ cells maintained in vitro [11, 12, 13]. More recently, centrioles in cortical neurons migrating radially within organotypic slices have been shown to move far in advance of the nucleus in the leading process [14]. This suggests that centrosome and nucleus largely dissociate each other during the migration cycle in both radially and tangentially migrating neurons.

Nuclear translocation allows nucleus and centrosome to "re-associate". Numerous studies have established that microtubule associated LIS1/dynein-dynactin motor complexes control forward nuclear movements [14-16]. A proposed mechanism is that LIS1/dynein motor complexes are associated to an array of microtubules that physically link the nucleus to the centrosome [6, 7]. In this system, dynein motor generates the force that move the nucleus closer to the centrosome. However, recent careful analysis of saltatory nuclear movements in cerebellar granule cells showed nuclei moving past the centrosome [17]. In these neurons, moreover, the perinuclear network of microtubules, the so-called "cage", does not converge to the centrosome and therefore

the centrosome unlikely pulls the nucleus forward.

These new observations question the physical association between nucleus and centrosome in neurons exhibiting independent movements of centrosome and nucleus and/or large scale/amplitude nuclear-centrosomal dissociations. In the present study, we analyzed by transmission electron tomography the organization of microtubules around centrioles and nucleus in migrating MGE cells, the future interneurons, at different stages of their migration cycle: when the nucleus and centrosome are largely dissociated and when they closely associate. Firstly, we observed an unexpected behavior of the mother centriole in tangentially migrating neurons. When located close to the nucleus, the mother centriole does not anchor microtubules but associates to a large distal vesicle. When located at a long distance from the nucleus, it anchors numerous microtubules and tightly binds to the plasma membrane where it associates to a primary cilium. This cyclic behavior of the mother centriole likely regulates cortical interneurons migration. Indeed, two networks of microtubules are present in migrating cortical interneurons: microtubules anchored to the centrosome and long microtubules non anchored to centrioles. Complex nuclear movements occur along microtubules extending forward independently of centrioles. How centrioles regulate these movements is still mysterious and should involve complex mechanisms.

## RESULTS AND DISCUSSION

Tangentially migrating MGE cells comprises a basal body that cycle between the cytoplasm and the plasma membrane. To associate transmission electron microscopy observations with characteristic steps in the migration cycle of MGE cells [12, 18], illustrated in supplemental Figure 1), cells were classified with regard to nucleus-centrioles distance and to the presence of a rostral swelling (nuclear centrosomal distance inferior to 2  $\mu\text{m}$ , superior to 2  $\mu\text{m}$  without swelling, superior to 2  $\mu\text{m}$  with clear swelling, Figure 1E). In migrating MGE cells observed by electron microscopy, the two centrioles differed by the presence of distal appendages on the mother (differentiated) centriole (Figure 1B2, C2, D2). Although distal appendages could be residual, in 22 out of 23 cells showing two centrioles sectioned longitudinally, mother and daughter centrioles were unambiguously identified. Analysis showed that mother centrioles located close to the nucleus ( $<2\mu\text{m}$ ) were most often located deep within cytoplasm (73%, Figure 1E), whereas mother/differentiated centrioles located more than 2  $\mu\text{m}$  away from the nucleus were most frequently associated to the plasma membrane (64% of distant complex centrioles, Figure 1, C1-C3, D1-D3, E). Moreover, differentiated centrioles located close to the nucleus were almost always associated to a large vesicle covering their distal end (88% of mother centrioles, Figure 1, A1-A3, B1-B3, E). Centrioles associated to the plasma membrane were prolonged by a short primary cilium in one case out of three (Figure 1D1,D2a). All together, these results show that the mother centriole of tangentially migrating MGE cells is a basal body that cycle between the cytoplasm and plasma membrane. Migration phases of future cortical interneurons can thus be correlated to centrosome subcellular localization; i) during the phase when nucleus and centrioles are grouped together, the basal body is located in the vicinity of nucleus and associates to a large vesicle; ii) during the phase when nucleus and centrioles are dissociated in two cell compartments (i.e. during nuclear resting phase), the basal body is bound to the plasma membrane where it can associate to a short primary cilium. Mother centriole covered by a large distal vesicle was occasionally observed at medium distance from the nucleus. Alternatively, membrane-bound basal bodies were rarely observed close to the nucleus (6 out of 56 cells), and

in this case, they frequently associated to a short primary cilium (3 cases out of 6). These observations are compatible with a temporal sequence reminiscent of basal body cycle in non neuronal cells [19], and comprising plasma membrane attachment of the basal body at a distance from the nucleus, nuclear translocation toward the primary cilium, and basal body withdraw from the plasma membrane after nuclear translocation.

The distal vesicle associated to basal body in MGE cells belongs to the cis-Golgi network. In some migrating MGE cells, a short cilium was observed within the vesicle associated to the mother centriole (see enlargement of Figure 4E), suggesting that this vesicle is closely related to ciliogenesis in migrating interneurons. Otherwise, the fusion of small vesicles to the apex of the large distal vesicle was currently observed in mother centriole localized near the nuclear membrane, suggesting that this large vesicle forms and grows up in the perinuclear compartment (white arrow head in Figure 1A2, and supplemental movie 1A). We thus examined the distribution of GMAP-210, a large protein able to bind both at cis-Golgi membranes by its N-terminal domain, and at microtubules minus end and centrosome by its C-terminal domain [20, 21] that could therefore be implicated in the biogenesis of the distal vesicle associated to the mother centriole. GMAP-210 is indeed expected to maintain Golgi vesicles around the centrosome and to favor their fusion [21]. Confocal observations showed that, GMMA-210 antibodies labeled a small cis-Golgi compartment independent of the CTR433 positive medial compartment in migrating MGE cells (Figure 2A1,4). In cells with rostrally migrated centrosome/Golgi apparatus complex, this GMAP-210 positive cis-Golgi compartment formed a small protrusion associated to the centrosome on the lateral side of the rostral swelling (Figure 2A). Upon brefeldin-A treatment, GMAP-210 does not redistribute in the ER but shows a vesicular pattern characteristic of proteins residing in the cis-Golgi network [22]. In migrating GE cells, brefeldin-A treatment that strongly disorganized the CTR433 positive medial Golgi compartment, increased the size of the GMAP-210 positive cis-Golgi compartment associated to the centrosome, showing recruitment of GMAP-210 positive vesicles to the centrosome (Figure 2B). In contrast, nocodazole treatment removed GMAP-210 from the centrosome suggesting that interaction of GMAP-210 with stable microtubules is required for centrosomal localization of this cis-Golgi compartment in tangentially migrating MGE cells (Figure 2B). All together, these observations suggest that the distal vesicle associated to mother centriole in tangentially migrating MGE cells belong to the GMAP-210 positive cis-Golgi network.

Mother centriole cyclically anchors microtubules in tangentially migrating MGE cells. We took advantage of the high resolution (~ 5 nm) along Z-axis of tomograms to reconstruct the network of microtubules in 200-300 nm thick semi-thin sections (Figure 3). Microtubules were traced individually using IMOD software (Boulder University) that allowed to follow individual microtubule in the plane of observation by rotating tomogram. Microtubules ending within tissue thickness were distinguished from microtubules sectioned at the surface of slices. 23 sections comprising one or both centrioles were reconstructed. Because semi-thin sections were prepared within the plane of migration of MGE cells, long microtubules oriented along the direction of migration were numerous. In sections with mother and/or daughter centrioles cut longitudinally, microtubules contacted the mother or daughter centriole at one extremity and distributed all around centrioles. As expected, mother centrioles linked additional microtubules on short lateral appendages. Remarkably, the number of laterally anchored microtubules strongly varied with mother centriole subcellular localization. None or very few microtubules were anchored to mother centrioles associated to a distal vesicle and located within cytoplasm (Figure 3D,E), whereas numerous microtubules were anchored to mother centriole bound to the plasma

membrane (Figure 3F,G,H). This suggests that mother centrioles associated to the plasma membrane show increased capacity to anchor and stabilize microtubules when compared to cytoplasmic mother centrioles. Ninein is a protein anchoring microtubules on mother centriole. We had previously shown a down regulation of ninein in the centrosome of MGE cells induced to migrate (Bellion et al, 05). We thus reexamined ninein expression in migrating MGE cells and observed large variations ranging from strong to complete lack of centrosomal staining (Supplemental Figure 2). Variations correlated well with Golgi apparatus morphology since ninein was absent in MGE cells with folded-up Golgi apparatus, whereas it was often present at the centrosome of cells with elongated Golgi apparatus (Supplemental Figure 2). Cyclic microtubule anchoring on mother centriole thus likely controls cyclic morphological changes of the Golgi apparatus. Accordingly, we had previously observed that nocodazole treatment destabilizing microtubules inhibits Golgi apparatus elongation in tangentially migrating MGE cells

A second remarkable feature of microtubules anchored to centrioles was their preferred orientation toward the leading edge. This property was observed whatever nuclear-centriolar distance, and was even more evident in cells with centrioles located near the nucleus. Thus no microtubule originating near a centriole was seen to contact or orient toward the nucleus in this case (except one microtubule in 8 sections, Figure 3A). In cells with the two centrioles distant from the nucleus (Figure 3B, F-H), the majority of microtubules anchored to centrioles were oriented toward the leading edge. Accordingly, most microtubules (76%) observed in the leading neurite behind centrioles passed along centrioles and extended further rostrally, toward the leading front of the cell (green microtubules in Figure 3B, G, H).

All together, these observations show that MGE cells contain two types of microtubules: centrosome anchored and extra-centrosomal microtubules. Centrosome-anchored microtubules are preferentially oriented toward the leading edge.

Depending on cells, microtubules were straight or sinuous suggesting that tensions applied to microtubules varied among cells and during the migration cycle. In one case, we observed one microtubule drawing a 180° turn close to the centriole and stopping nearby (Figure 3B).

Whether centrosome moves freely or not in the cytoplasm between two phases of plasma membrane attachment remains to be determined.

Long microtubule bundles extend between the nucleus and centrosome, on which nuclear membrane can glide. In MGE cells with dissociated nucleus and centrosome, most microtubules distributed between the nucleus and the rostral centrosome were not anchored to centrioles. We thus analyzed the organization of microtubules near the nucleus during this phase. Microtubules present in the rostral part of the nuclear compartment converged toward the thin link connecting the nucleus to the rostral swelling (Figure 4A and movies 4A1 and 4A2). In all segments of link that were analyzed, microtubules were continuous. At the exit of the link, long microtubules diverged into the swelling. In one cell showing maximal nuclear-centrosome dissociation, microtubules present in the link mainly stopped in front of the nuclear membrane and did not enter the perinuclear compartment (Figure 4B). Accordingly, stable dephosphorylated microtubules were no longer observed in the perinuclear compartment whereas they distributed at the rostral pole of the nucleus prior nuclear-centrosomal dissociation. In contrast, dynamic tyrosinated microtubules were observed around the nucleus at all phases of the migration cycle (Supplemental Figure 3).

Very few microtubules (2 or 3 in 6 reconstructed sections) were seen to contact the external nuclear membrane (white arrow in Figure 4B). And tomographic analysis showed that the thin



and highly stretched nuclear membrane protrusions observed at the rostral side of the nucleus were gliding over microtubules fascicle. Microtubules did not attach to these membranous protrusions that comprised inner nuclear membrane as attested by immunostaining against laminB1 (Figure 4G1,2). Because long protrusions were associated to round or oval nucleus and correlated to long distance nucleus-centrosome dissociation (Figure 4D-F) they unlikely correspond to starting nuclear translocation. In contrast, translocating nuclei show complex shapes and rather large rostral edge (Figure 4H).

We had previously shown that the nucleus and centrosome of migrating cortical interneurons alternatively segregate in two cell domains connected by a thin link and alternatively group again. Here we show that these cyclic transformations are associated to cyclic changes in the subcellular positioning and functional properties of the mother centriole that could function as an intermittent sensor [19] at the cell surface to regulate the migration cycle.

## METHODS

*Culture experiments.* Swiss mice embryos were produced in our animal facility according to international guidelines. Medial ganglionic eminence (MGE) cells at embryonic stage 13.5 (E13.5) were cultured in vitro for two days on cortical axons, as explained elsewhere (Bellion et al, Baudoin et al, 08). Co-cultures for electron microscopy were performed on sterile plastic coverslips (Thermanox, Nalge Ni-unc, Rochester, NY) coated with polylysine-laminine as glass coverslips.

*Immunostaining.* Co-cultures were fixed in 4% paraformaldehyde/ 0.33 M sucrose at 4°C for tubulin immunostaining, and in -20°C methanol for 10 minutes for Golgi apparatus and  $\gamma$ -tubulin immunostaining. GMAP-210 was visualized with RM130 rabbit serum (1/3000), medial Golgi apparatus with CTR433 mouse IgG (1/100),  $\gamma$ -tubulin with a rabbit serum (1/500) or mouse IgG (1/500, Sigma), GFP with a rabbit serum (1:1000; Molecular Probes, Eugene, OR), tyrosinated tubulin with rat IgG (YL1/2, 1/1000, Abcam, Cambridge, UK), glutamylated tubulin with a rabbit serum (L4, 1/1000, generous gift of A. Andrieux, CEA, Grenoble France), and Alexa 488- or Cy3-coupled secondary antibodies (1:400; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) diluted in PBS/2% NGS/0.2% Triton X-100.

*Electron microscopy.* Before alcoholic dehydration and inclusion in Araldite, cultures were colored in 1% uranyl acetate in maleate buffer. Small blocks with individual MGE cells migrating on cortical axons were separated from the rest of the culture under binocular microscope. Semi-thin sections (300 nm) parallel to the plastic coverslips were collected on copper grids (Maxtaform Finder type H6, 200 mesh, Oxford Instruments, Abingdon, UK). Sections were colored with Reynolds solution and incubated in 10 or 15-nm colloidal gold particles coupled to secondary antibodies (Aurion, Wageningen, Netherlands) to serve as fiducial markers for subsequent image alignment.

*Tomography series acquisition.* Sections were selected first with a Philips CM100 electron microscope, and then transferred to the cryo holder of a Zeiss EM912 Omega electron microscope operating at 120 KV and controlled by a software for tomography series acquisition (Boudier et al, 2005). Images were captured every 1° over a  $\pm 55^\circ$  range with a CCD camera (Gatan, Oxford, UK) at low magnification (X5000) which prevented double axis acquisitions due to frequent bar proximity. All tomograms were modeled slice by slice. Tomograms reconstruction and 3D models were realized with ETomo and IMOD softwares (IMOD package

3.9.3, Boulder University, USA). Centrioles were represented as tubular graphical objects, appendages as points and connecting fibers as tubes. Microtubules were tracked as open contours. Microtubules ends located within slices were modeled as large dots. Nuclear and plasma membranes were represented as open contours and visualized as lines.

## BIBLIOGRAPHY

1. Gregory, W.A., et al., *Cytology and neuron-glia apposition of migrating cerebellar granule cells in vitro*. *J Neurosci*, 1988. **8**(5): p. 1728-38.
2. Hayashi, K., et al., *Inhibitory neurons from fetal rat cerebral cortex exert delayed axon formation and active migration in vitro*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 21): p. 4419-28.
3. Schliwa, M., et al., *Centrosomes, microtubules and cell migration*. *Biochem Soc Symp*, 1999. **65**: p. 223-31.
4. Ueda, M., et al., *Centrosome positioning and directionality of cell movements*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(18): p. 9674-8.
5. Etienne-Manneville, S., *Cdc42--the centre of polarity*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 8): p. 1291-300.
6. Higginbotham, H.R. and J.G. Gleeson, *The centrosome in neuronal development*. *Trends Neurosci*, 2007. **30**(6): p. 276-83.
7. Tsai, L.H. and J.G. Gleeson, *Nucleokinesis in neuronal migration*. *Neuron*, 2005. **46**(3): p. 383-8.
8. Rakic, P., *Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex*. *J Comp Neurol*, 1972. **145**(1): p. 61-83.
9. Rivas, R.J. and M.E. Hatten, *Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons*. *J Neurosci*, 1995. **15**(2): p. 981-9.
10. Solecki, D.J., et al., *Par6alpha signaling controls glial-guided neuronal migration*. *Nat Neurosci*, 2004. **7**(11): p. 1195-203.
11. Schaar, B.T. and S.K. McConnell, *Cytoskeletal coordination during neuronal migration*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(38): p. 13652-7.
12. Bellion, A., et al., *Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear*. *J Neurosci*, 2005. **25**(24): p. 5691-9.
13. Higginbotham, H., et al., *GSK3beta and PKCzeta function in centrosome localization and process stabilization during Slit-mediated neuronal repolarization*. *Mol Cell Neurosci*, 2006. **32**(1-2): p. 118-32.
14. Tsai, J.W., K.H. Bremner, and R.B. Vallee, *Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue*. *Nat Neurosci*, 2007. **10**(8): p. 970-9.
15. Tsai, J.W., et al., *LIS1 RNA interference blocks neural stem cell division, morphogenesis, and motility at multiple stages*. *J Cell Biol*, 2005. **170**(6): p. 935-45.
16. Dujardin, D.L., et al., *A role for cytoplasmic dynein and LIS1 in directed cell movement*. *J Cell Biol*, 2003. **163**(6): p. 1205-11.
17. Umeshima, H., T. Hirano, and M. Kengaku, *Microtubule-based nuclear movement occurs independently of centrosome positioning in migrating neurons*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(41): p. 16182-7.
18. Metin, C., et al., *Cell and molecular mechanisms involved in the migration of*

*cortical interneurons*. Eur J Neurosci, 2006. **23**(4): p. 894-900.

19. Dawe, H.R., H. Farr, and K. Gull, *Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 1): p. 7-15.

20. Infante, C., et al., *GMAP-210, A cis-Golgi network-associated protein, is a minus end microtubule-binding protein*. J Cell Biol, 1999. **145**(1): p. 83-98.

21. Rios, R.M., et al., *GMAP-210 recruits gamma-tubulin complexes to cis-Golgi membranes and is required for Golgi ribbon formation*. Cell, 2004. **118**(3): p. 323-35.

22. Rios, R.M., et al., *A peripheral protein associated with the cis-Golgi network redistributes in the intermediate compartment upon brefeldin A treatment*. J Cell Biol, 1994. **125**(5): p. 997-1013.

## LEGENDS

### **Figure 1: The mother centriole in tangentially migrating MGE cells is a basal body that cycles between perinuclear cytoplasm and the plasma membrane in the rostral swelling.**

**A1-D3:** Centrioles ultrastructure in four MGE cells at different stages of the migration cycle. In semi-thin sections parallel to the plane of migration (A1,B1,C1, D1), a small area containing both centrioles (dotted square) was analyzed by electron tomography. Selected planes in tomograms are shown in A2, B2, C2, D2 (complete tomograms are supplementary movies 1A,1B, 1C, 1D) and corresponding 3-D reconstructions in A3, B3, C3, D3 (mother centriole -MC- is yellow, daughter centriole -DC- red, distal vesicle and plasma membrane white, nuclear membrane blue). Mother centriole (MC) identified by lateral and/or distal appendages (ap) is intracytoplasmic when located close to the nucleus (n in A1, B1) and associates to the plasma membrane when located at a distance from the nucleus (C1, D1), specifically in rostral swelling (sw in C1). MC near nucleus are associated to a single large vesicle (v) by their distal end (A2, B2), whereas MC addressed to the plasma membrane are associated to a short or residual primary cilium (C2, D2), that reveals the basal body (BB) function of MC in tangentially migrating MGE cells. **E:** Table shows the frequencies of mother centrioles (MC or BB) associated to a distal vesicle or to a primary cilium as a function of nuclear-MC distance (close -1,4- versus distant -2,3-) and as a function of plasma membrane-MC distance (associated -3,4- or not -1,2-). 56 cells with longitudinally sectioned MC were analyzed. Scale bars (A2, B2, C2, D2) 100 nm. c.fb, connecting fibers; m, microtubules.

### **Figure 2: A cis-Golgi compartment resistant to brefeldin A treatment associates to the centrosome through stable microtubules.**

Double staining of cis-Golgi network with GMAP-210 antibodies, medial Golgi apparatus (GA) with CTR433 antibodies, and centrioles with  $\gamma$ -tubulin antibodies in migrating MGE cells with the centrosome/GA complex close to the nucleus (A1-A3) or distant from the nucleus (A4-A6, B). **A:** GMAP-210 antibodies label a cis-Golgi compartment negative for CTR433 antibodies (white arrow in A1, A4), as shown along centrioles located close to cell surface in the swelling (A5, white arrow, compare with A6). **B:** Nocodazole induced microtubules destabilization produces a redistribution of the medial GA at some distance of the centrosome and remove the cis-Golgi network from the centrosomal region (White arrow heads point to the centrosome in high magnification panels). In contrast, Brefeldin A treatment that induces a complete disorganization of the medial Golgi, spares a large GMAP-210 positive cis-Golgi compartment associated to the centrosome.

### **Figure 3: Microtubules anchor to the mother centriole only when it is attached to the plasma membrane.**

Panels show flattened views of 3-D reconstructions of the mother (yellow) and daughter (red) centrioles, microtubules that contact or end close to centrioles (same color as centrioles), microtubules passing along centrioles or interrupted far away from centrioles (green), and nuclear (blue) or plasma (white) membrane. **A:** lateral view of the tomogram used for 3-D reconstruction shows microtubules ending within slice (small dot at the tip), microtubules sectioned at slice surface (white arrows), and microtubules ending near centriole (red). **A, B, C:** in sections with centrioles either close (A) or far away (B) from the nucleus, microtubules anchored or ending nearby centrioles are preferentially oriented toward the leading edge. Difference is significant in spite of large variability among slices (C, student T-test,  $p < 0.01$ ). Centrosomal microtubules are

parallel to long microtubules independent of centrioles (green). **D, E, F, G, H:** Mother centriole (MC) associated to the plasma membrane in leading process (F,G) or in rostral swelling (H) attach numerous microtubules on its side. In contrast, lateral microtubules are never seen on MC associated to a distal vesicle and located close to the nucleus (D) or in the leading process (E). In contrast, daughter centrioles bind microtubules whatever their localization, and orientation within slice (G, H).

**Figure 4: Nuclear shapes and microtubules organization between centrosome and nucleus change during forward centrosome migration.**

A1-C2: 3-D reconstructions of microtubules, nuclear membrane (blue) and plasma membrane (white) from tomograms show the organization of microtubules in the perinuclear compartment, in the nuclear-centrosomal link, and at the exit of the link. A1 shows the morphology of the cell analyzed in A2. Tomograms show long continuous microtubules ending in the rostral region of the nucleus. A very few number contact the nuclear membrane, and a some of them stop ahead the nucleus. Tomographic analysis of thin membranous expansion rostral to the nucleus (C1) suggests gliding movements over microtubules present in the link (C2).

D-F: Ultrastructure of MGE cells nucleus fixed at different stages of the cycle of migration. The early stage of distal vesicle formation by fusion of numerous small vesicle (D) occurs in the vicinity of the nucleus and is associated to elongated nucleus. In a cell showing limited nuclear-centrosomal dissociation (E), the mother centriole is intracytoplasmic and associates to a short cilium (black arrow) internal to the distal vesicle. The nucleus send a thin protrusion in the leading neurite. At stage of longer nuclear-centrosomal dissociation (F), the nucleus extend an tiny membranous protrusion. G1: lamin B1 antibodies stain a thin nuclear membrane protrusion in MGE cells showing nuclear-centrosomal dissociation and redistribution of endoplasmic reticulum (revealed with BIP antibodies) outside the perinuclear compartment (compare with G2).

H: Translocating nucleus shows complex morphology with a round rostral edge.

**Supplemental Figure 1: Basal body cycle parallels the migration cycle in tangentially migrating cortical interneurons. Interpretative scheme.**

During the first phase of the migration cycle, the basal body (yellow) firstly assembles a vesicle (dark red) at its distal end in the perinuclear compartment, and then moves rostrally to the leading process. At the end of the first phase the basal body moves to the plasma membrane, fuse to it by its distal vesicle and presents a primary cilium at the cell surface. By this time, the mother centriole / basal body anchors numerous microtubules oriented parallel to the cell surface. It should accumulate ninein and associate to elongated Golgi apparatus.

During the second phase of the migration cycle, when the nucleus moves rostrally toward the centrosome, the basal body leaves the plasma membrane and moves to the perinuclear cytoplasm. At this stage of the cycle, centrosomal microtubules might lose their centrosomal anchoring and become non-centrosomal microtubules. Centrosome should leave its ninein staining and associate to folded-up Golgi apparatus.

A long network of microtubules (green) running from the nucleus (blue) to the swelling location, distinct from centrosomal microtubules (red) might guide centrioles forward movements during the first migration phase, and nuclear translocation during the second migration phase. Nuclear membrane might transiently glides along microtubules during this first phase of forward centrosomal movement.

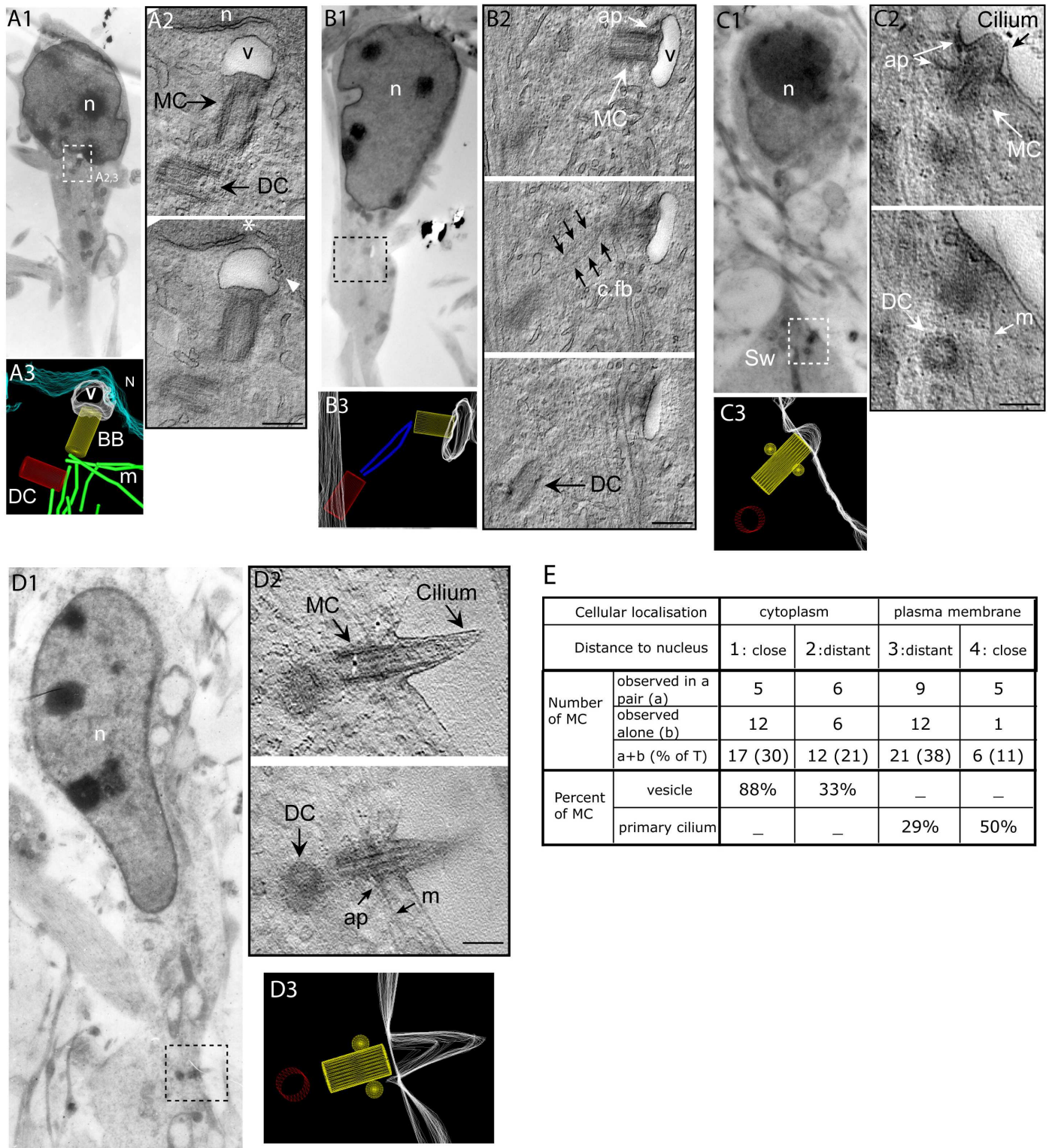


**Supplemental Figure 2: Variations of ninein expression in migrating MGE cells.**

**A1-B2:** Strong ninein staining of the centrosome (green) is associated to elongated Golgi apparatus (red) whereas faint ninein staining is associated to folded-up Golgi apparatus. **C:** Quantitative study shows that faint ninein staining is correlated to GA folding independently of nuclear centrosomal distance, whereas Golgi apparatus elongation does not systematically correlate with strong ninein staining. Medial Golgi apparatus is revealed with CTR433 antibodies.

**Supplemental figure 3:** Distribution in soma and leading neurite of stable microtubules labeled with antibodies to glutamylated tubulin (A1, B1) , and of dynamic microtubules labeled with antibodies to tyrosinated tubulin (A2, B2). GFP expressing MGE cells (green) migrate over a carpet of cortical axons revealed with antibodies to tubulin (red). Two phases of migration are illustrated: nucleus-centrosome grouping (A1, A2) and nuclear centrosomal dissociation (B1, B2).

Figure 1



**E**

Cellular localisation		cytoplasm		plasma membrane	
		1: close	2: distant	3: distant	4: close
Number of MC	observed in a pair (a)	5	6	9	5
	observed alone (b)	12	6	12	1
	a+b (% of T)	17 (30)	12 (21)	21 (38)	6 (11)
Percent of MC	vesicle	88%	33%	–	–
	primary cilium	–	–	29%	50%

Figure 2

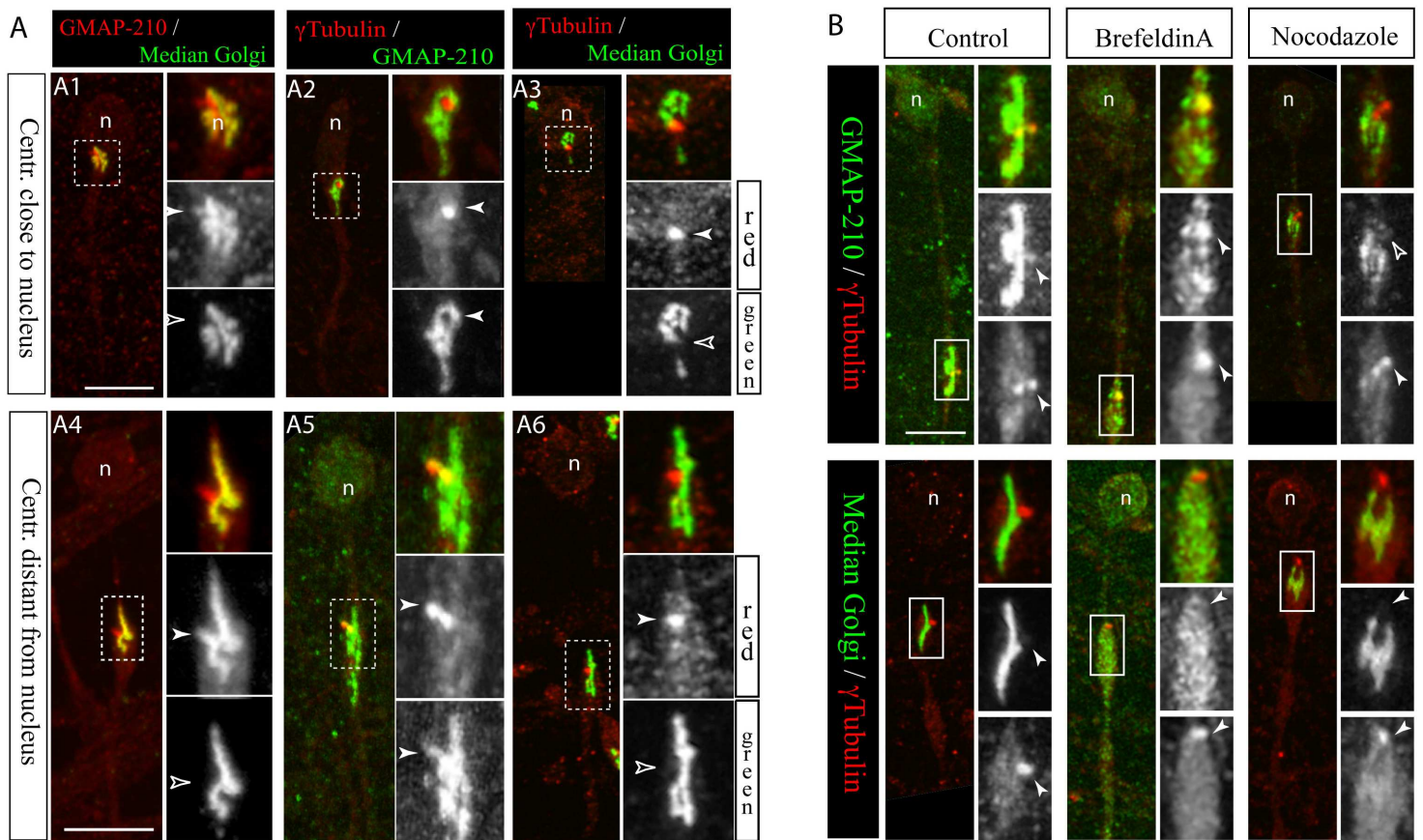




Figure 3

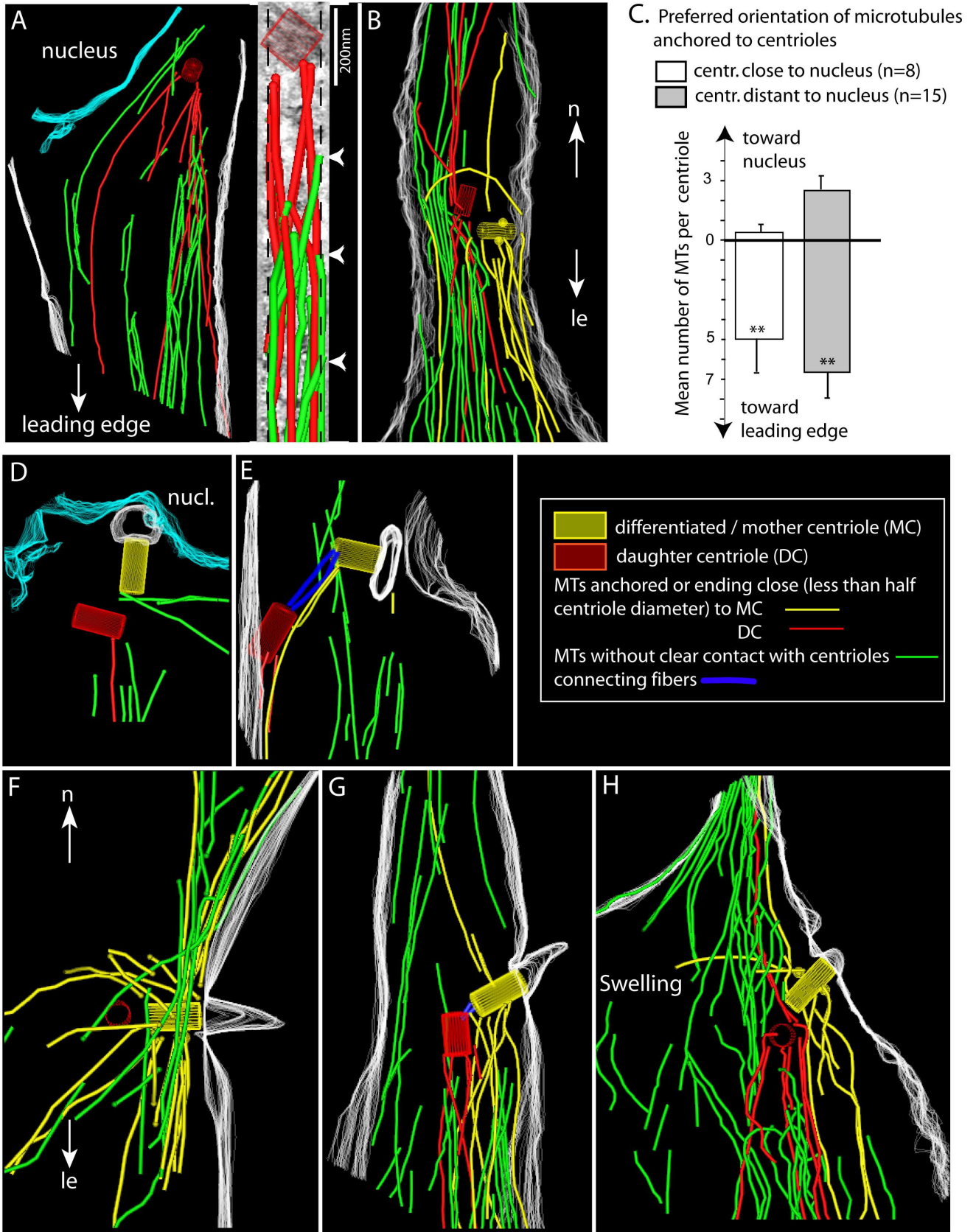
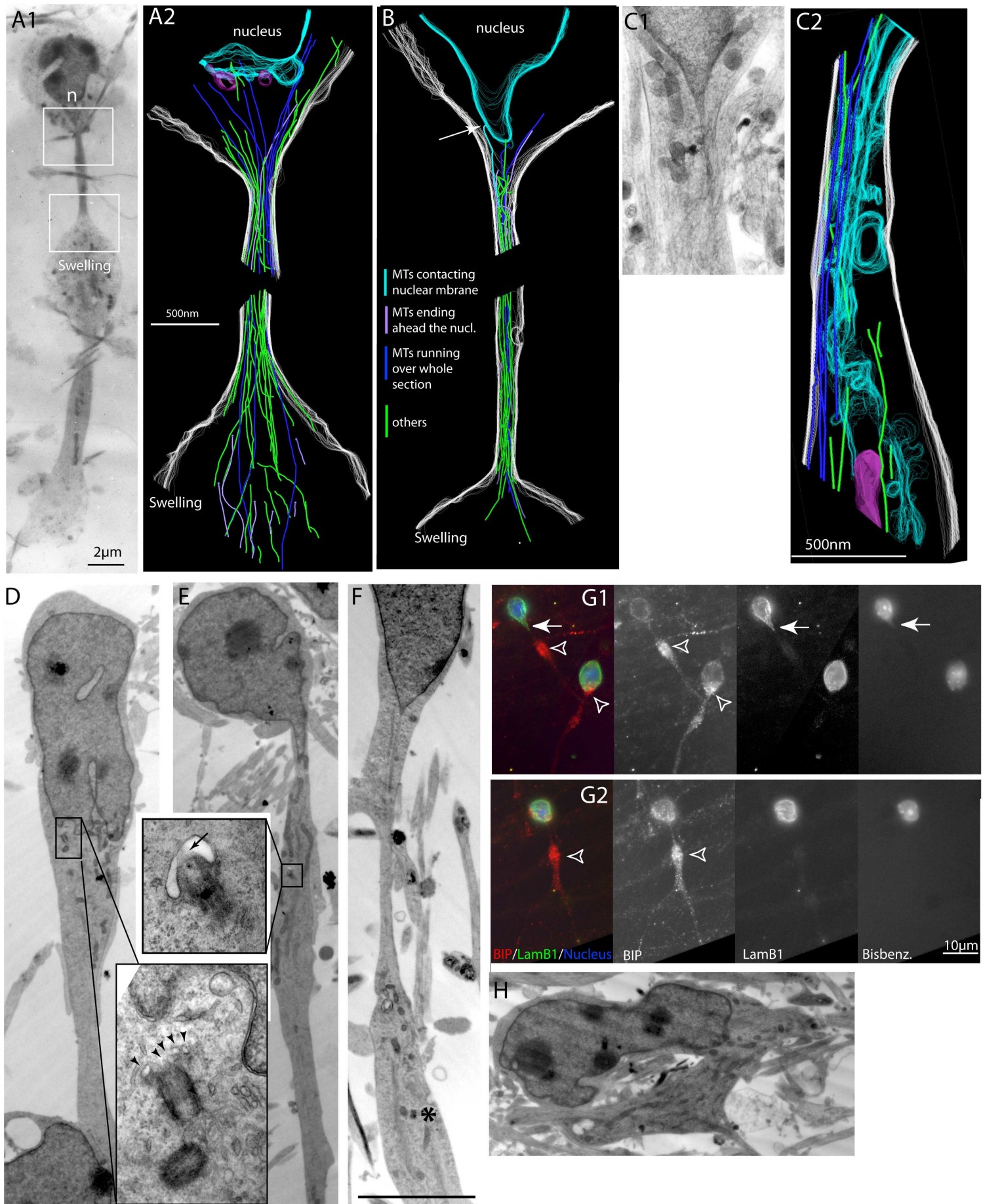


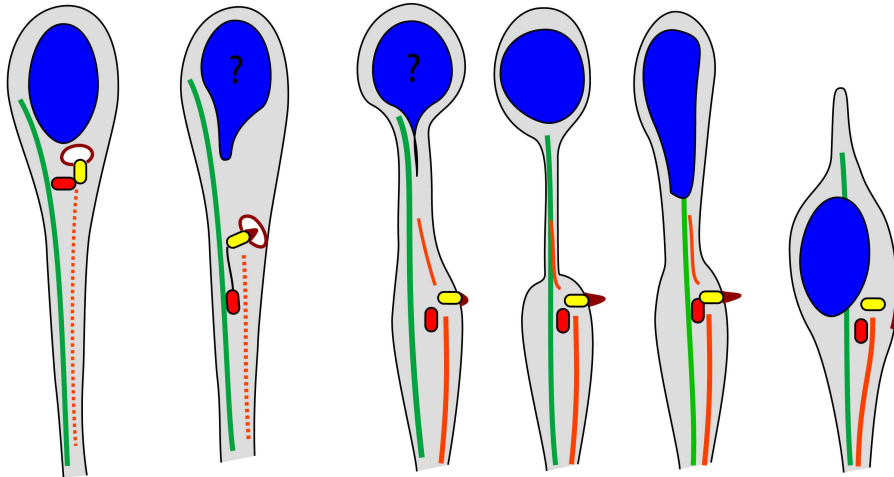
Figure 4





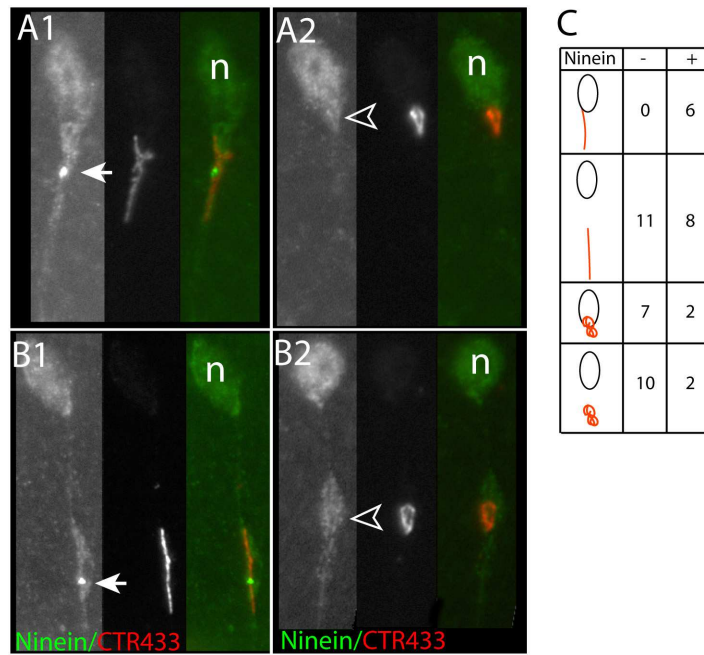
Supplemental figure 1

1

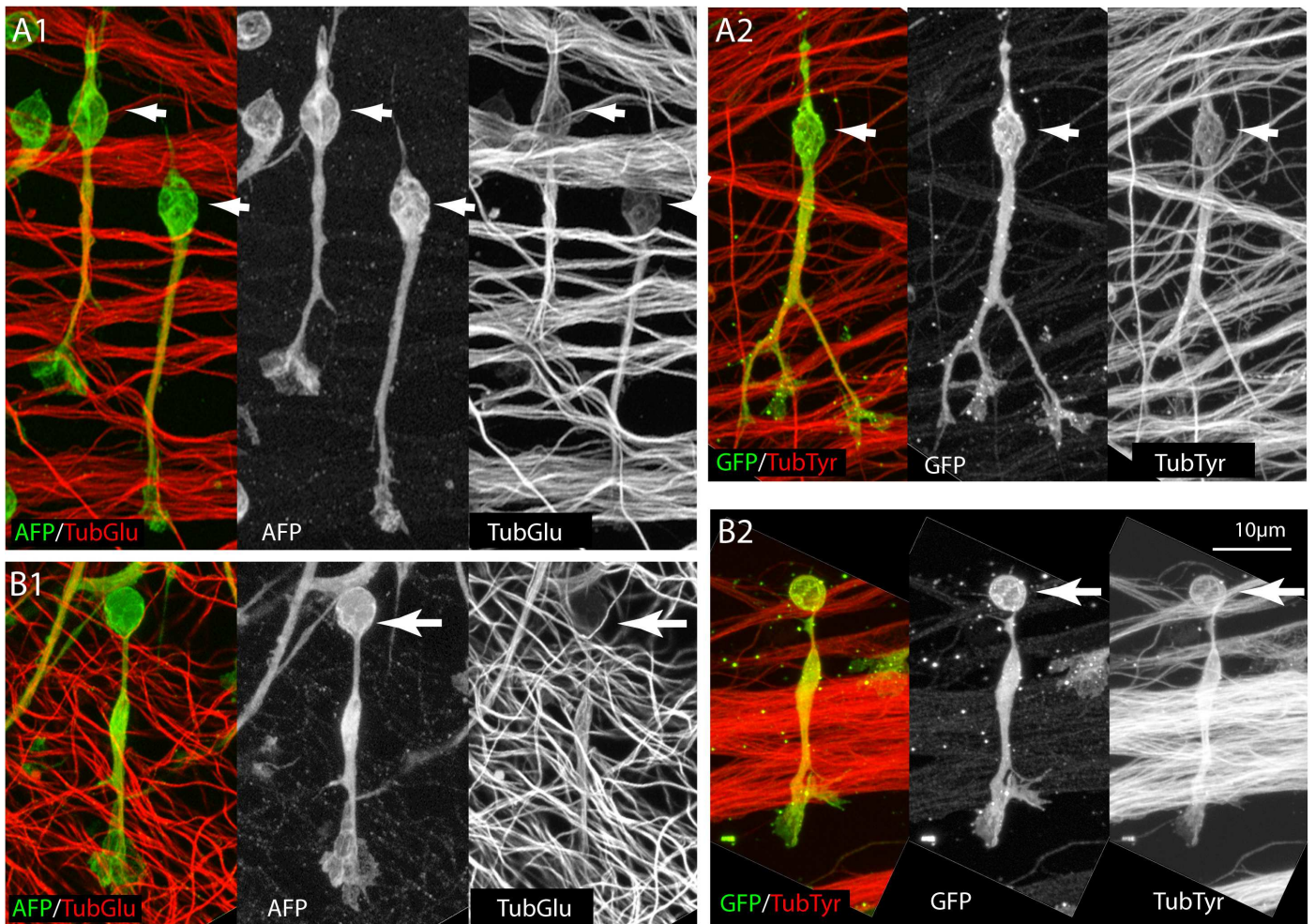


2

Supplemental figure 2



Supplemental figure 3



***ARTICLE 4***

## Article en préparation

Etude pharmacologique du couplage entre le noyau et le complexe centrosome/appareil de Golgi dans les interneurons corticaux en migration.

La stabilité des microtubules est cruciale pour contrôler la morphologie et la polarité des interneurons corticaux, et permet ainsi à ces cellules de migrer de façon dirigée (Baudoin et al. 2008). Durant leur migration, les interneurons corticaux présentent un cycle stéréotypé, durant lequel le noyau et le centrosome sont cycliquement découplés puis recouplés (Bellion et al. 2005). La phase de découplage correspond à une phase où le noyau est stationnaire et où le centrosome migre avec l'appareil de Golgi dans un renflement du neurite de tête. La phase de recouplage correspond au mouvement du noyau vers le centrosome après que ce dernier se soit stabilisé à distance du noyau (Fig.1).

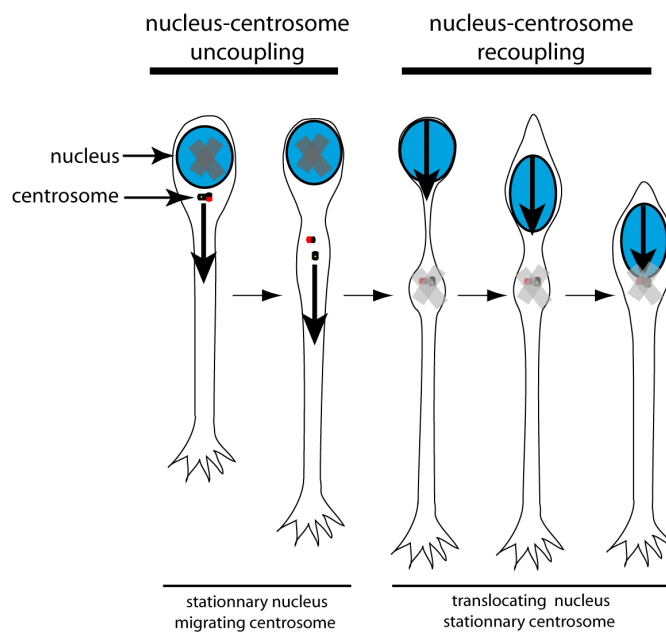
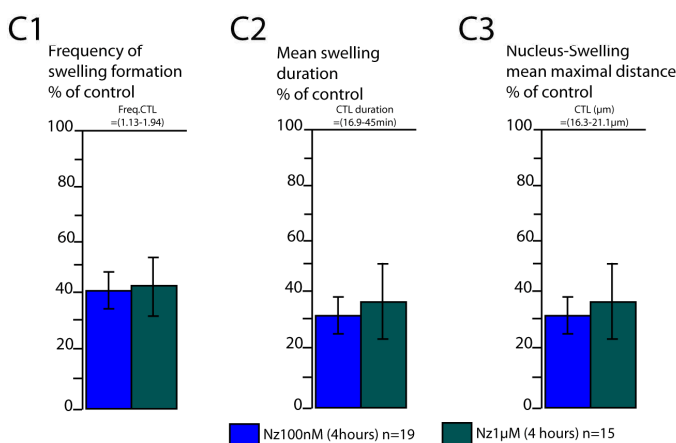
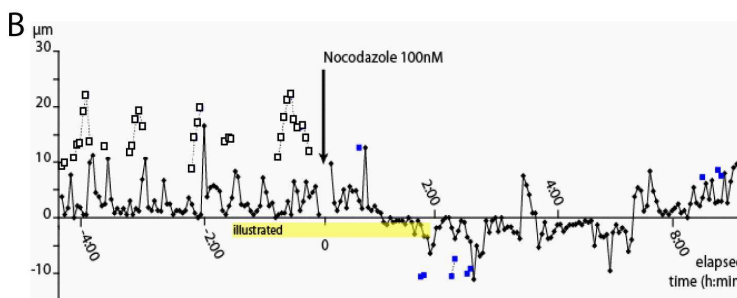
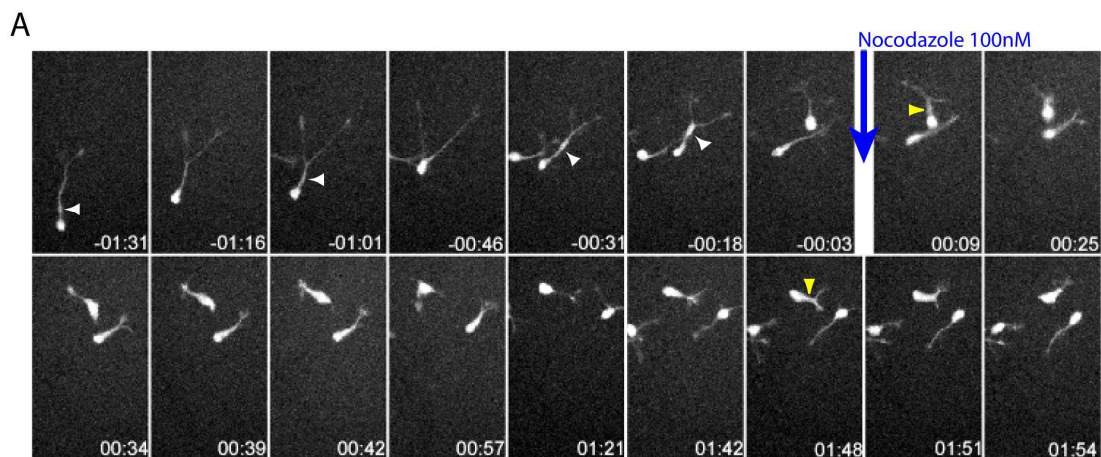


Figure 1. Scheme of the cyclic coupling between the nucleus and the centrosome in migrating cortical interneurons.



Nos expériences pharmacologiques de déstabilisation des microtubules des interneurons corticaux en migration par du nocodazole ont révélé des effets supplémentaires de ceux décrits plus haut, sur le couplage entre le noyau et le renflement contenant le centrosome et l'appareil de Golgi. En présence de nocodazole, le renflement se forme moins souvent, et lorsqu'il se forme, c'est à une distance du noyau plus courte que dans les cellules contrôle (Fig.2 ; voir Movie1 de Baudoin et al. 2008). La présence du centrosome dans le renflement des cellules traitées avec du nocodazole à une concentration de 100nM a été vérifiée par immunocytochimie. En revanche, le traitement pharmacologique avec du nocodazole à une concentration de 1µM délocalise les protéines centriolaires du centrosome, ce qui ne nous a pas permis de conclure quant à la présence ou l'absence du centrosome dans le renflement de ces cellules. De façon surprenante, nous n'avons pas observé d'effet de la dose de nocodazole appliquée sur la fréquence de formation du renflement, sa durée de vie ou sa distance maximale par rapport au noyau. Le processus de découplage du noyau et du complexe centrosome/appareil de Golgi, n'est donc que partiellement dépendant de la stabilité des microtubules.



**Fig2.**  
 Swelling formation in nocodazole treated MGE cells.  
 A) Time-lapse sequence of a MGE cell migrating on cortical dissociated cells, before and after nocodazole 100nM application (arrow) (white arrow head: swelling before nocodazole application; yellow arrow head: swelling after nocodazole application) (Time in h:min).  
 B) Graph showing for the same cell as in (A) the spontaneous nuclear movements (black squares) and the swelling position before (white squares) and after (blue squares) Nz100nM application.  
 C) Quantifications of time-lapse recordings show that microtubules destabilization or depolymerization induces a decrease in the frequency of formation of the swelling (C1) and decreases in the duration of the swelling (C2) as well as its mean maximal distance from the nucleus (C3). There is no effect of the dose of the Nz application on the behavior of the swelling (C1,C2,C3).  
 Quantitative analysis was performed on 15 (Nz100nM) and 19 cells (Nz1µM) imaged in 2 independent experiments.

Il a été montré, dans d'autres modèles cellulaires, que la dépolymérisation des microtubules stimule par le biais de la Rho-GTPase Rho la contractilité du système d'acto-myosine (Liao et al. 1995 ; schéma Fig.3). Ainsi, le défaut de découplage entre le noyau et le centrosome dans les cellules traitées au nocodazole pourrait être dû à une augmentation de la contractilité du système d'acto-myosine provoquée par une suractivation de la voie Rho.

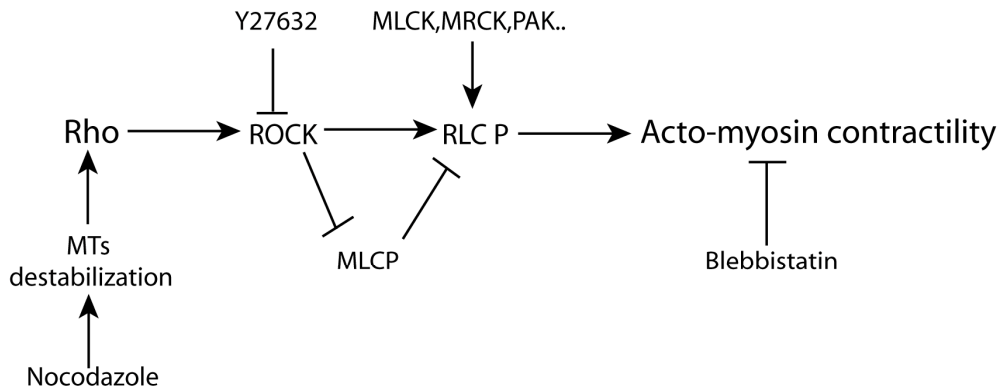
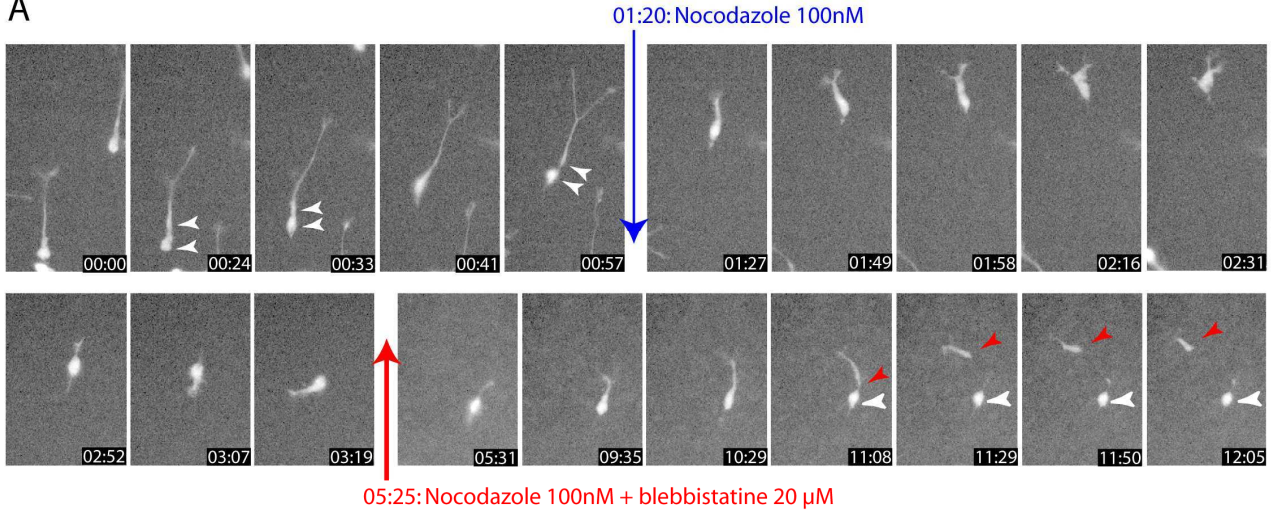


Figure 3. Regulation of actomyosin contractility by the Rho pathway, and its pharmacological control. MTs destabilization after nocodazole treatment induces Rho activation and thereby an increase in actomyosin contractility.

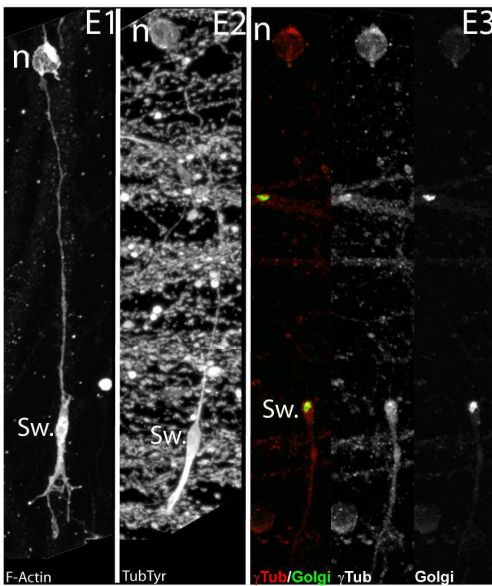
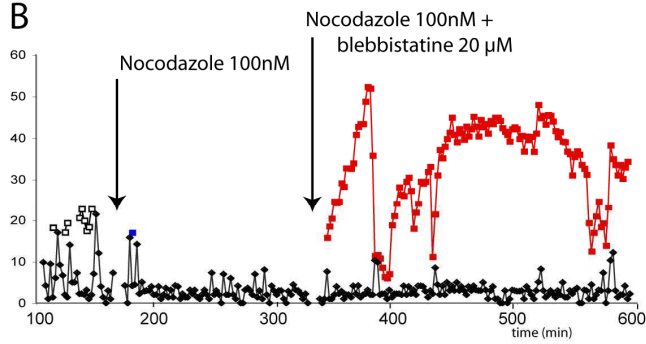
Nous avons donc testé si nous pouvions corriger les défauts de découplage entre le noyau et le centrosome dans les cellules traitées au nocodazole, en inhibant la contractilité du système d'acto-myosine. Pour cela, nous avons appliqué simultanément de la blebbistatine, l'inhibiteur spécifique de la myosine II non-musculaire (voir Fig.3) et du nocodazole (100nM). Lorsque l'on ajoute au nocodazole de la blebbistatine à une dose élevée (70µM), les mouvements nucléaires et cellulaires sont complètement abolis (non illustré). En revanche, lorsque la blebbistatine est appliquée à faible dose (20µM), la combinaison des deux drogues induit un effet très spectaculaire : les mouvements nucléaires sont bloqués et les compartiments somatique et centrosomal se découlent: le centrosome et l'appareil de Golgi peuvent alors migrer très loin du noyau (jusqu'à 40-50µm ; Fig. 4 et Movie 1 ; Movie 2). Le centrosome est capable de retourner vers le noyau, lequel pourra alors transloquer vers le centrosome. Ainsi, alors que la déstabilisation par le nocodazole inhibe la séparation du noyau et du centrosome, l'inhibition supplémentaire de la contractilité du système d'acto-myosine dans les cellules traitées au nocodazole provoque un découplage spectaculaire entre ces deux organites et la formation d'un lien extrêmement fin entre ces derniers.

Nous avons ensuite vérifié si la contractilité excessive de l'acto-myosine dans les cellules traitées au nocodazole et ses conséquences sur le comportement du centrosome était due à une suractivation de la voie Rho. Pour cela, nous avons utilisé de l'Y27632, une drogue qui inhibe de façon spécifique l'activité de la protéine p160ROCK, une kinase effectrice de Rho qui régule l'activité de la myosine II (voir schéma Fig.3). L'inhibition de la protéine p160ROCK par le Y27632 et la déstabilisation conjointe des microtubules entraînent une dissociation des compartiments nucléaire et centrosomal de même amplitude que les dissociations entraînées par l'application d'un mélange nocodazole-blebbistatine, mais de durée plus importante, suggérant que l'effet de l'inhibition de p160ROCK sur le découplage noyau-centrosome est plus fort que celui de l'inhibition de la myosine II (Fig. 4D ; Movie 3 et Movie 4).

A

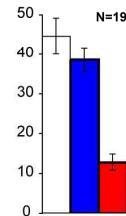


B

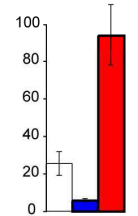


Nz100nM+BB20μM

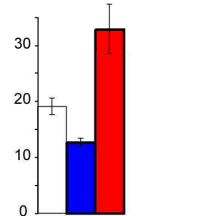
C1 Mean migration speed (μm/h)



C2 Mean Swelling duration (min)



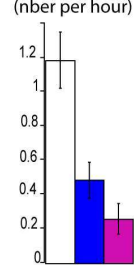
C3 Nucleus-Swelling mean maximal distance (μm)



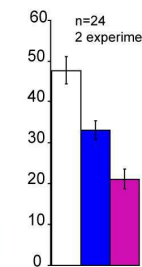
CTL (-4:0h) ND 100nM (0:4h) Nz 100nM + Blebbistatin 20 μM (6:10h)

Nz100nM+Y27632 100μM

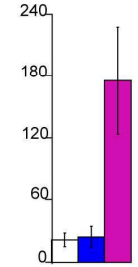
D1 Frequency of swelling formation (nber per hour)



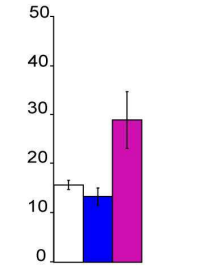
D2 Mean migration speed (μm/h)



D3 Mean Swelling duration (min)



D4 Nucleus-Swelling mean maximal distance (μm)



CTL (-4:0h) Nz100nM (0:4h) Nz100nM + Y27632 100μM (4:8h)



**Figure 4. Pharmacologically induced nucleus-swelling dissociation.**

A) Time-lapse sequence of a MGE cell migrating on dissociated cortical cells, during a control period, after nocodazole 100nM application (Nz100, blue arrow) and after Nz100 plus blebbistatin 20µM application (Nz100+BB20, red dart). White double arrow-heads show nucleus-swelling dissociation during control period. In the presence of Nz100+BB20 the nucleus and the swelling show large and long lasting dissociation (White and red arrows) (time lapse in h:min).

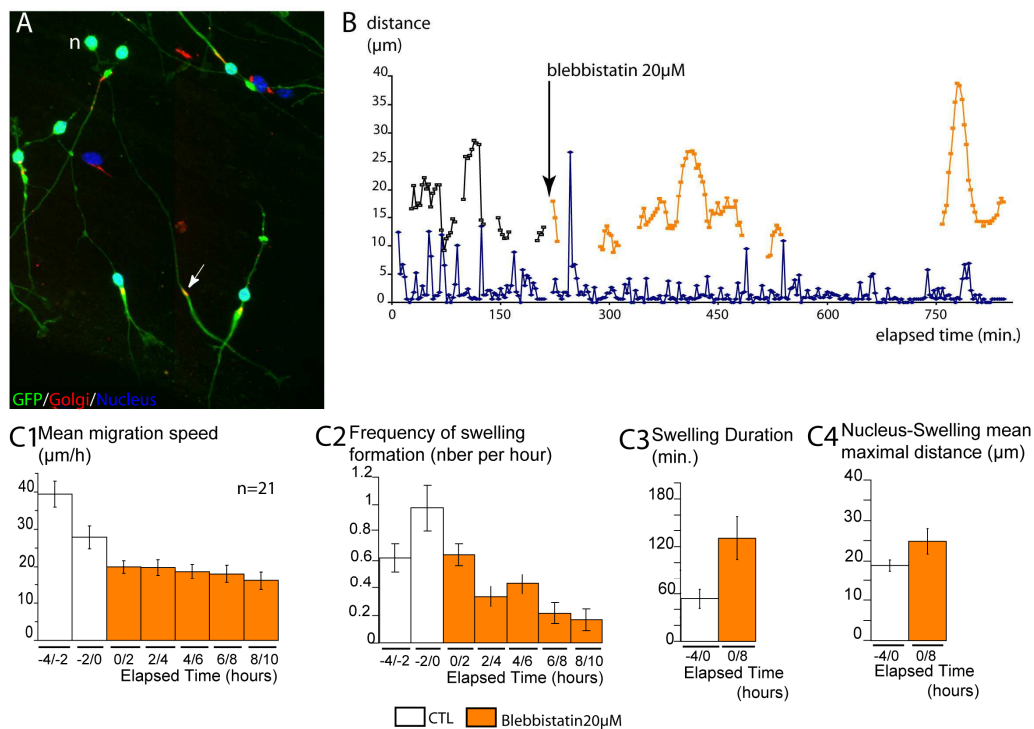
B) Graph shows for the cell illustrated in (A) instantaneous nuclear movements (black squares) and nuclear-swelling distance in each frame during a control period (white squares) and following Nz100 (blue squares) and Nz100+BB20 applications (red squares).

C) Time-lapse analysis of nuclear and swelling movements during a control period and after Nz100 and Nz100+BB20 applications. Nz100+BB20 application reduces significantly the migration speed (more than 50%) (C1), increases swelling duration (of about 400%, C2) and increases the mean distance between the nucleus and the swelling (C3).

D) Time-lapse analysis of nuclear and swelling movements during a control period and following Nz100 and Nz100+Y27632 100µM application (N100+Y27632). N100+Y27632 application decreases the speed of migration in a two-fold manner (D2), greatly increases swelling duration (of about 900%, D3), consistent with a big decrease in the frequency of swelling formation (D1). As after N100+BB20 application, nucleus-swelling mean maximal distance is increased (D4).

E) Immunostainings of MGE cells migrating on cortical axons treated with Nz100+ BB20. The soma and the swelling of Nz100+ BB20 are enriched in F-actin (E1). Microtubules are predominantly present in the swelling (E2) but are also present in the link between the swelling and the soma. The swelling of MGE cells treated with Nz100+ BB20 contains the centrosome and the Golgi apparatus (E3).

Ces expériences suggèrent que l'activité du système d'acto-myosine, sous le contrôle de la voie Rho, est impliquée non seulement dans les mouvements du noyau mais aussi dans le couplage du noyau avec le centrosome. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons testé l'effet de doses modérées de blebbistatine, appliquée seule, sur la migration des interneurons corticaux. L'inhibition de la myosine II entraîne des défauts de migration des cellules, cohérents avec nos résultats déjà publiés (Bellion et al. 2005) : les translocations nucléaires sont moins rapides et moins fréquentes. Mais l'inhibition de la myosine II entraîne aussi des défauts de couplage entre le noyau et le centrosome (Fig. 5 ; Movie 5 et Movie 6), qui se stabilise à une distance plus importante du noyau qu'en condition contrôle, et deux fois plus longtemps que dans les cellules contrôles.



**Fig.5 Myosin II inhibition with Blebbistatin 20µM.**

A) In MGE cells migrating on cortical axons treated with Blebbistatin 20µM the Golgi apparatus can be observed far away from the nucleus (n nucleus, arrow Golgi apparatus) (GFP in green; median Golgi in Red).

B) Graphical representation of nucleus (blue squares) and swelling positions in a MGE cell imaged during a control period of 4hours (white squares for the positions of the swelling) and following blebbistatin 20µM application (BB20; orange squares for position of the swelling).

C) Quantification of time-lapse recordings show that BB20 induces a slight decrease in the velocity of nuclear translocations (C1), a reduction in the frequency of swelling formation (C2), an increase in the life time of the swellings (C3) and an increase in mean maximal nucleus-swelling distance (C4).

Nous avons également vérifié que l'inhibition de la voie d'activation de la myosine II dépendante de la protéine p160ROCK est impliquée dans ce mécanisme. L'application d'Y27632 entraîne une diminution de la vitesse de migration des cellules comparable à celle observée avec la blebbistatine (20 $\mu$ M), qui se traduit par une diminution de la surface de migration explorée par les cellules autour de leur explant d'origine (Fig.6). L'application d'Y27632 inhibe les mouvements nucléaires alors que le complexe centrosome/Golgi est capable de migrer loin: le « recouplage » noyau/centrosome se produit encore moins souvent, ce qui induit une très forte augmentation de la durée de vie des renflements (Fig. 6; Movie 7 et Movie 8). Ces défauts de la dynamique des cellules traitées de l'Y27632 sont associés à des défauts morphologiques, en particulier une importante augmentation de la longueur du neurite de tête. Les cellules traitées avec de la blebbistatine à faible dose (20 $\mu$ M) semblent présenter des défauts morphologiques du même type qui restent à quantifier.

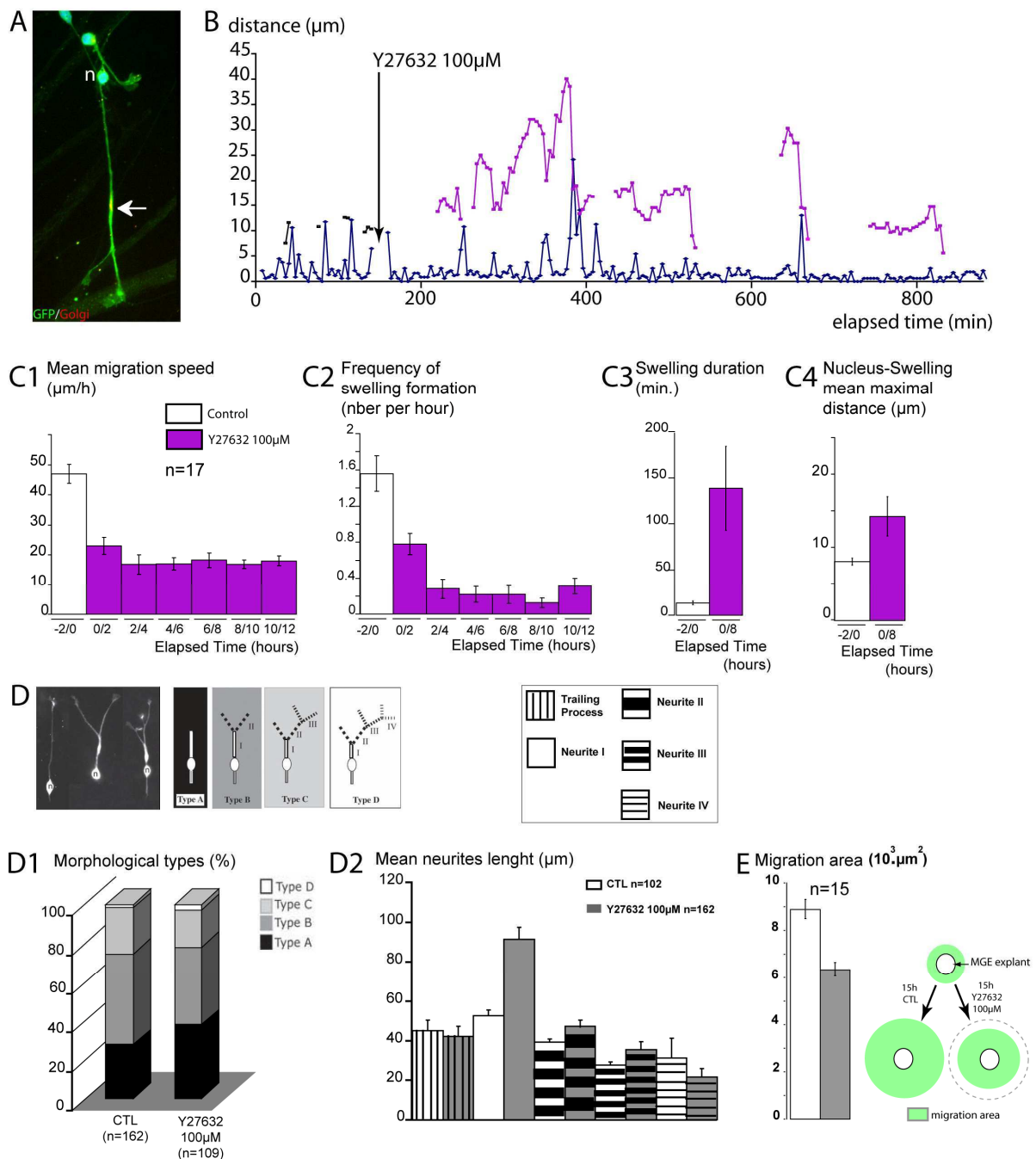




Fig.6 p160ROCK inhibition with Y27632 100µM.

A) In MGE cells migrating on cortical axons treated with Y27632 100µM the Golgi apparatus complex can be observed far away from the nucleus (n nucleus, arrow Golgi apparatus)(GFP in green, median golgi in red).  
 B) Graphical representation of nucleus (blue squares) and swelling positions in a MGE cell imaged for 3hours of control period (white squares for the positions of the swelling) and after Y27632 100µM application (Magenta squares for the positions of the swelling).  
 C) Quantifications of time-lapse recordings show that Y27632 100µM application induces a rapid two-fold decrease in the migration speed (C1), a decrease in the frequency of swelling formation (C2), and increases swelling duration (C3) and its mean maximal distance from the nucleus (C4) (substrat= cortical axons).  
 D) Morphological analysis of MGE cells migrating on cortical axons show that 24hours of Y27632 100µM application increases the proportion of the most simple morphologies of MGE cells (typeA), and increases the length of the leading neurite (D2).  
 E) 15hours of Y27632 100µM application induces a decrease in the migration area of MGE cells around their explants (E) (substrat= cortical dissociated cells).

L'ensemble de ces observations suggère que dans les interneurons corticaux en migration la contraction de l'acto-myosine contrôle la phase de ré-association entre le noyau et le complexe centrosome/Golgi, et que la contractilité de ce système est activée par la voie Rho.

Afin de connaître la contribution de la dynéine, moteur moléculaire associé aux microtubules, dans le contrôle du couplage entre le noyau et le complexe centrosome/appareil de Golgi dans les interneurons corticaux en migration, nous avons testé l'effet de l'inhibition de la dynéine dans ces cellules. Pour cela, nous avons utilisé de l'ortho-vanadate de sodium, une drogue qui inhibe l'activité de la dynéine. L'inhibition conjointe de la myosine II et de la dynéine dans les interneurons corticaux en migration entraîne des défauts des mouvements nucléaires et de très importants défauts de couplage entre le noyau et le centrosome (Fig. 7 ; Movies 9 et 10). L'inhibition de la dynéine augmente l'effet de l'inhibition de la myosine II sur le couplage entre le noyau et le centrosome : le centrosome est capable de migrer très loin du noyau (jusqu'à 50-60µm), puis de se stabiliser longtemps (90min) pour revenir vers le noyau. Le renflement qui contient le centrosome durant sa migration est alors d'aspect lâche.

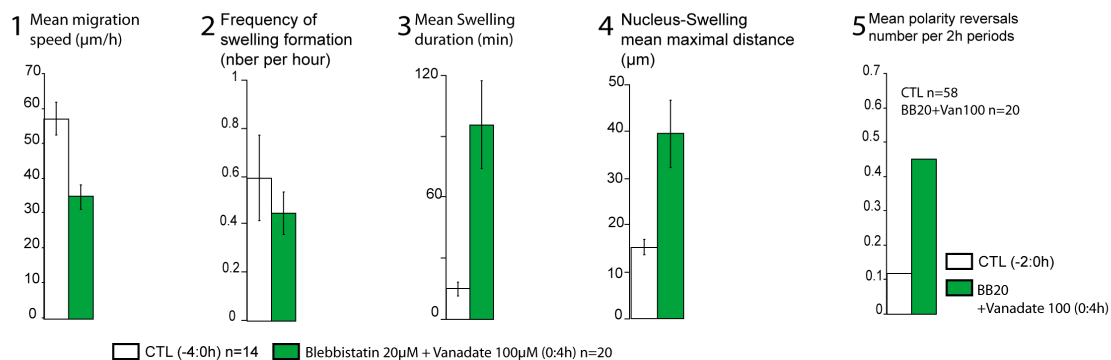


Fig.7 Myosin II with blebbistatin plus dynein inhibition with Sodium Ortho-Vanadate

Quantifications of time-lapse recordings show that blebbistatin 20µM plus Sodium OrthoVanadate 100µM (BB20+Van100) application induces a decrease in the mean speed of MGE cells migration (1). BB20+Van100 application slightly decreases the frequency of swelling frequency (2), and increases swelling life time (3). The most impressive effect by BB20+Van100 application is a strong increase of the mean maximal distance of the swelling from the nucleus (4). Furthermore, MGE cells treated with BB20+Van100 exhibit numerous polarity reversals (5).

La dynéine semble donc participer au contrôle du couplage entre le noyau et le complexe centrosome/appareil de Golgi dans les interneurons corticaux en migration. L'inhibition conjointe de la myosine II et de la dynéine provoque de plus de très fréquentes inversions de polarité (Fig.7), comme ce que l'on peut observer après traitement des cellules d'EGM avec du nocodazole (Baudoin et al. 2008). Ce résultat illustre peut-être un rôle supplémentaire de la dynéine, qui contrôlerait aussi la stabilisation de la polarité des interneurons corticaux en migration. L'inhibition seule de la dynéine n'inhibe pas la nucléokinèse des interneurons corticaux, mais induit une diminution de la fréquence d'apparition des renflements (Fig.8 ;

Movies 11 et 12). Cet effet peut être dû 1) au contrôle du couplage entre le noyau et le complexe centrosome/Golgi, et/ou 2) au contrôle de la stabilisation de la polarité dans les interneurons corticaux en migration. Une vérification de l'effet de l'inhibition de la dynéine seule sur la polarité des interneurons corticaux en migration permettra de mieux comprendre le rôle de ce moteur moléculaire associé aux microtubules.

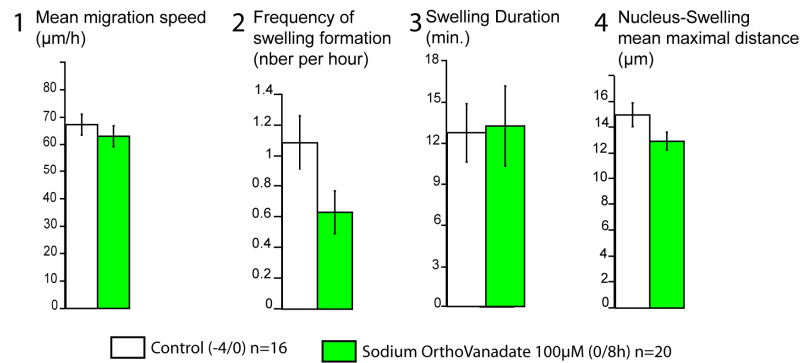


Fig8. Dynein inhibition with Sodium Orthovanadate.

Quantification of time-lapse recordings show that Sodium Ortho-Vanadate 100µM application induces no change in the speed of migration of MGE cells (1). Sodium Ortho-Vanadate 100µM application impairs swelling formation as shown by the decrease in swelling formation frequency (2), but it does not impair its life time (3) or its mean maximal distance from the nucleus (4).

Enfin, nous avons vérifié l'effet de la stabilisation des microtubules induite par du taxol sur la migration des interneurons corticaux. Nous avons observé que la stabilisation des microtubules inhibe fortement les mouvements du noyau et inhibe très fortement la formation d'un renflement à distance du noyau (Fig. 9 ; Movies 13 et 14). Quand un renflement se forme tout de même, il reste bloqué à faible distance du noyau, avant qu'éventuellement le noyau ne le rejoigne. Le taxol induit en outre l'apparition de nombreux filopodes très actifs au niveau des neurites résiduels et du soma, et un effet notable sur la polarité des cellules qui reste à quantifier.

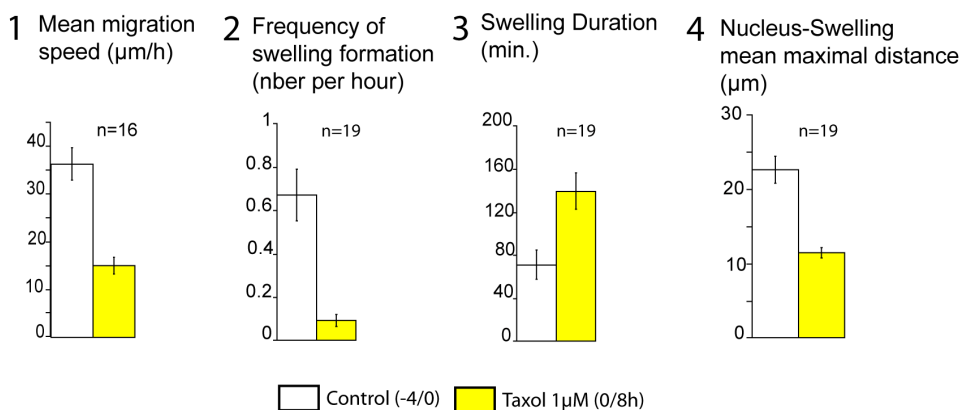


Fig.9 Microtubules stabilization with Taxol

Quantifications of time-lapse recordings show that taxol 1µM inhibits nuclear translocations (1) and strongly reduces swelling formation, as shown by the decrease in swelling formation frequency (2). Taxol induces an increase in the duration of the few swellings that form (3), and a decrease in their mean maximal distance from the nucleus (4).

Ainsi, ces résultats montrent que le couplage entre le noyau et le complexe centrosome/Golgi est contrôlé à la fois par le cytosquelette d'acto-myosine et par les microtubules. On peut élaborer un modèle dans lequel :

- La contractilité du système d'acto-myosine est nécessaire à la réassociation du noyau et du complexe centrosome/appareil de Golgi,
- Le relâchement de l'acto-myosine associé au mouvement des microtubules qui implique la dynéine, stimule et/ou permet le découplage des deux compartiments (voir Fig.10).

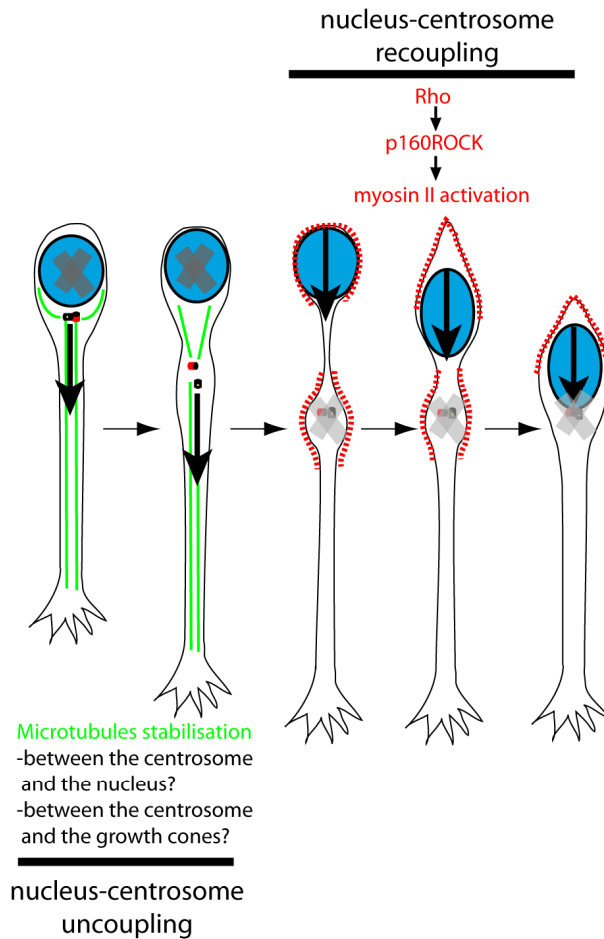
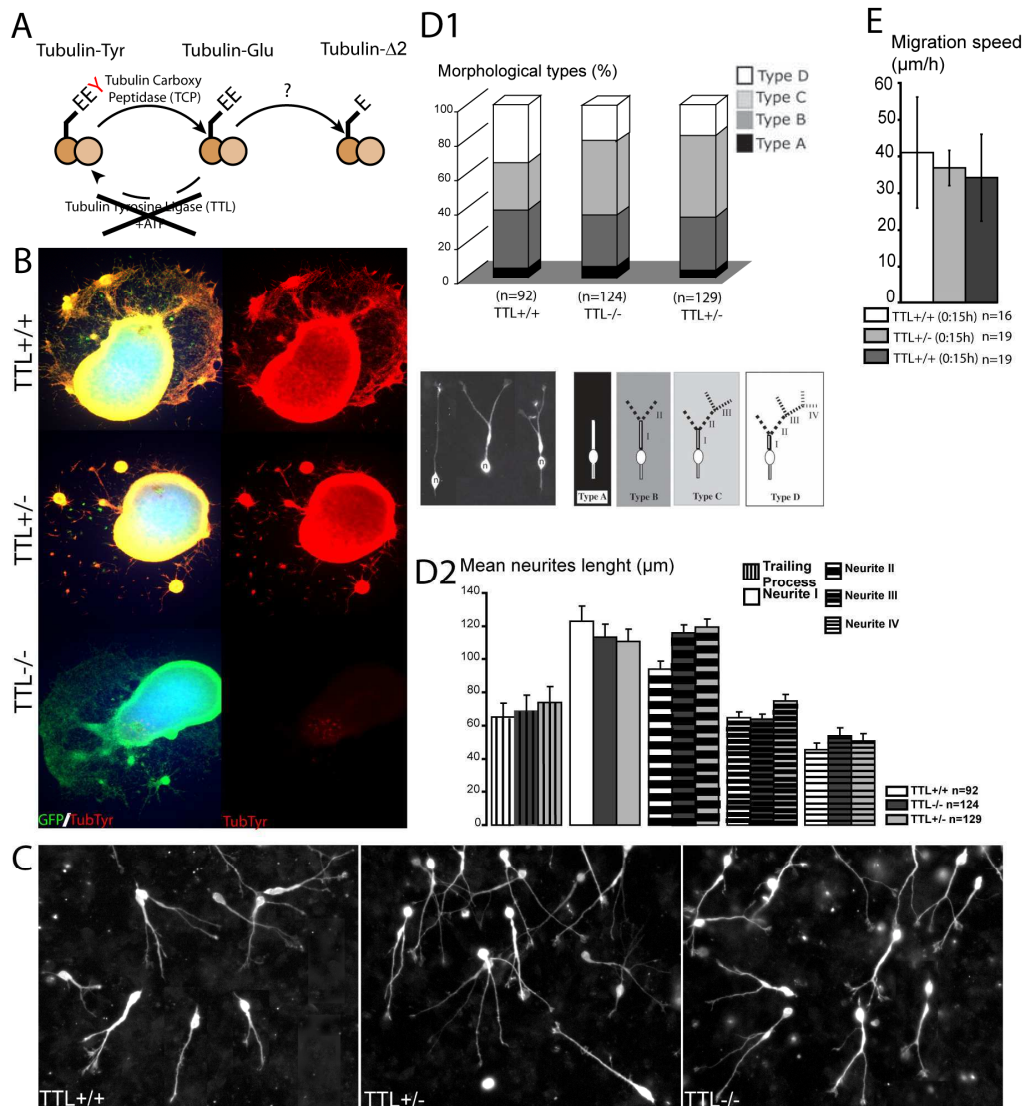


Figure 10. Scheme of the control by microtubules and acto-myosin cytoskeleton of the cyclic coupling between the nucleus and the centrosome in migrating cortical interneurons.

***ETUDE DE LA MIGRATION DES CELLULES  
d'EGM MUTANTES POUR LA TTL***

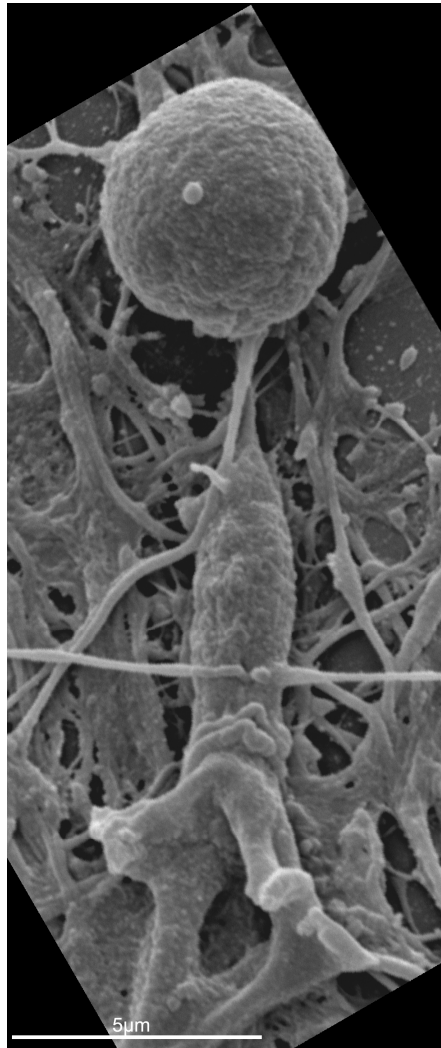
Dans la cadre de mon étude sur le rôle des microtubules dans la migration des interneurons corticaux, et par le biais d'une collaboration avec le laboratoire de Didier Job du CEA de Grenoble, j'ai pu réaliser une étude de la migration des interneurons corticaux issus d'embryons mutants pour l'enzyme qui catalyse l'ajout d'un résidu de tyrosine sur la tubuline, la TTL (Tubulin-Tyrosin Ligase). Cette étude n'a pas mis en évidence de défaut majeur du mécanisme de migration *per se* des cellules mutantes pour la TTL (voir vidéos Movie1 à Movie 3). Néanmoins, je n'ai pas recherché les potentiels effets de cette mutation sur la transduction de signaux, de guidage par exemple, qui pourraient expliquer l'effet de la mutation sur le développement cortical des animaux mutants pour la TTL. Des potentiels effets de la mutation à ce niveau ne sont donc pas exclus.



Morphological and time-lapse recordings analysis of migrating TTL+/+, TTL+/- and TTL-/- MGE cells.

- A) Scheme of tubulin de-tyrosination and tyrosination cycle by the TCP and the TTL enzymes.  
 B) TTL-/- MGE cells migrating on cortical axons lack tyrosinated-tubulin (tyrosinated-tubulin in red, GFP in green).  
 C) Migrating MGE cells from wild-type and mutant mice migrating on dissociated cortical cells (GFP staining).  
 D) Morphological analysis of TTL+/+, +/- and -/- MGE cells migrating on cortical dissociated cells. D1 quantification of the percentage of each cell type in each genotype reveal no major effect of the mutation on the neuritic arborization of MGE cells.; D2 neurites length quantifications show no obvious difference between each genotype.  
 E) Quantification of time-lapse recordings of MGE cells migrating on cortical axons, reveal no major difference between the mean migration speed of MGE cells from wild-type and mutant mice.





*Vue en microscopie électronique à balayage  
d'un interneurone cortical en migration sur des axones de cortex.*

## ***DISCUSSION***

## **I Rôle des microtubules dans la migration des interneurons corticaux**

Au cours de cette étude, j'ai pu mettre en évidence différents rôles des microtubules dans la migration des interneurons corticaux.

Dans un premier temps, j'ai démontré que la morphologie des interneurons corticaux est dépendante de la stabilité des microtubules.

En effet, la légère déstabilisation des microtubules provoquée par l'application de nocodazole (Nz) à une concentration de 100nM entraîne un raccourcissement des neurites et une simplification de l'arbre neuritique des interneurons corticaux. La dépolymérisation (1µM Nz) des microtubules se traduit par la perte de l'arbre neuritique et de la polarité des cellules, qui deviennent alors multipolaires.

Les autres travaux relatifs à l'effet de la déstabilisation des microtubules sur la morphologie des neurones en migration montrent que la morphologie des cellules est plus ou moins affectée, dépendant des doses de nocodazole employées et des types cellulaires considérés.

En effet, il apparaît que les grains du cervelet conservent leur morphologie bipolaire lorsque la dépolymérisation des microtubules ne fait disparaître que les microtubules dynamiques (1µM Nz), mais ces cellules perdent leur polarité lorsque des doses plus fortes de nocodazole font disparaître la fourche de microtubules stables devant le noyau (10µM Nz; Umeshima et al. 2007).

La situation est plus complexe concernant les neurones de la zone sous-ventriculaire. En effet, l'effet-dose n'est pas respecté dans les expériences réalisées sur ces cellules : dans une première étude une déstabilisation légère des microtubules fait perdre leur polarité aux neurones de la ZSV (160nM Nz; Higginbotham et al. 2006), qui est en revanche conservée dans une seconde étude où les doses de nocodazole sont plus fortes (1µM Nz; Shaar et McConnell 2005).

Ainsi, il apparaît que d'une part la stabilité des microtubules n'est pas égale dans tous les types neuronaux, à en juger par les effets différents provoqués par des doses identiques de nocodazole. D'autre part la stabilité des microtubules semble nécessaire pour que les neurones conservent une morphologie polarisée. En particulier, la présence d'une fourche de microtubules stables devant le noyau des neurones granulaires du cervelet semble cruciale pour maintenir une polarité stable.

Dans un deuxième temps, j'ai démontré que la motilité des interneurons corticaux n'est pas bloquée par la déstabilisation des microtubules : l'application de doses modérées (100nM) ou fortes (1µM) de nocodazole ne bloque pas la motilité de ces cellules. Cette dernière est tout de même diminuée de moitié à fortes doses.

Dans les grains du cervelet, la perte des microtubules dynamiques (1µM Nz) ne perturbe pas non plus la motilité des cellules, qui est en revanche bloquée après addition de très fortes doses de nocodazole (10µM Nz ; Umeshima et al. 2007). De même, la dépolymérisation des microtubules à forte dose de nocodazole (1µM) ne bloque pas la motilité des neurones de la zone sous-ventriculaire (Schar et McConnell 2005).

Ainsi, seule la motilité des grains est bloquée après une forte dépolymérisation des microtubules qui détruit les microtubules même les plus stables. Sinon, la motilité des cellules est conservée dans tous les types cellulaires considérés, sous des traitements de nocodazole modérés ou forts. Il semblerait que la condition à la motilité des cellules soit la présence de microtubules stables. Cette hypothèse est cohérente avec la présence de microtubules stables dans les interneurons corticaux en migration sous une forte dose de nocodazole (1µM). J'ai pu réaliser des essais de doses massives de nocodazole (10µM) avec des cultures fixées qui effectivement laissent à penser que la destruction de tous les microtubules bloque également

la motilité des interneurons corticaux. Ceci reste à vérifier en dynamique, mais est fortement probable en raison de l'effet dépendant de la dose de nocodazole appliquée sur la motilité des interneurons corticaux.

Troisièmement, la déstabilisation des microtubules (100nM de Nz) dans des interneurons corticaux en migration ne bloque pas la formation d'un renflement à distance du noyau et le positionnement du centrosome dans celui-ci. En revanche, le découplage noyau-centrosome est moins fréquent et la distance moyenne noyau-centrosome est diminuée, avec un effet indépendant de la dose de Nz appliquée. La stabilité des microtubules est donc nécessaire à la persistance de la migration du centrosome à distance du noyau.

Dans les neurones de la zone sous-ventriculaire, des doses comparables de nocodazole (160nM) bloquent en revanche le découplage noyau-centrosome. Ce dernier est toujours motile dans le soma mais n'est plus capable de quitter ce compartiment (Higginbotham et al. 2006).

En outre des doses plus fortes de nocodazole qui dépolymérisent les microtubules (1 $\mu$ M Nz) ne bloquent pas la formation d'un renflement dans les des interneurons corticaux, ainsi que dans les neurones de la zone sous-ventriculaire (Schaar et McConnell 2005). La présence ou l'absence du centrosome dans ce renflement n'est en revanche pas connue.

Il semble donc que la stabilité des microtubules soit nécessaire au positionnement du centrosome par rapport au noyau dans tous les types de neurones considérés. La motilité du centrosome ne semble pas dépendre de la stabilité des microtubules. En revanche, la déstabilisation des microtubules inhibe son déplacement à distance du noyau, distance qui de plus est diminuée

Quatrièmement, le comportement migratoire des interneurons corticaux soumis à des doses modérées de nocodazole (100nM) est comparable du point de vue du cycle de migration à celui qui se déroule dans des conditions contrôles, si ce n'est que les cellules ne stabilisent pas leur polarité : les inversions de polarité sont beaucoup plus fréquentes qu'en condition contrôle, et sont encore plus augmentées après traitement des cellules avec une forte dose de nocodazole (1 $\mu$ M). Il y a donc là un effet dépendant de la dose de nocodazole appliquée.

Il n'existe malheureusement pas aujourd'hui, hormis nos travaux, d'études relatives au comportement migratoire des neurones traités avec du nocodazole. On ne peut sur ce point-là que spéculer en corrélant la morphologie des cellules avec un éventuel comportement migratoire.

Dans les interneurons corticaux en migration, la déstabilisation des microtubules induit un comportement migratoire de type multipolaire, avec de fréquentes inversions de polarité, sans doute induites par les défauts de positionnement du centrosome si l'on se réfère aux autres études. On peut s'interroger sur le fait qu'il n'existe pas d'effet dépendant de la dose sur le comportement du centrosome et en revanche qu'il existe concernant la polarité de ces cellules.

L'étude que j'ai réalisée comparée aux données de la littérature permet de suggérer l'hypothèse selon laquelle le rôle des microtubules dans les interneurons corticaux est similaire à celui effectué dans les autres types de neurones en migration : la stabilité des microtubules ne semble pas nécessaire à la motilité des neurones, mais semble en revanche nécessaire pour i) que les neurones conservent une morphologie bipolaire ii) que le centrosome soit capable de se dissocier spatialement du noyau et qu'il se positionne à distance de celui-ci et enfin iii) que les cellules puissent migrer de façon dirigée.

Mais nos expériences de traitement simultané avec du nocodazole et de la blebbistatine, un inhibiteur de la myosine II (voir article 4) démontrent que la déstabilisation des microtubules n'empêche pas le découplage entre le noyau et le centrosome. Ainsi, peut-être est-ce en fait le repositionnement du centrosome à distance du noyau qui est affectée par la déstabilisation des microtubules. La stabilisation des microtubules représente donc peut-être un moyen d'immobiliser le centrosome à distance du noyau une fois qu'il a migré, et de contrôler aussi par là sa position. En effet, dans les dissociations noyau-centrosome extrêmes observées en présence de nocodazole et de blebbistatine, le centrosome ne parvient pas à se positionner, et gagne même des localisations très lointaines du noyau, qu'il n'aurait pas forcément adoptées en situation contrôle. Néanmoins, de telles dissociations sont quelquefois observées en condition contrôle, ce qui suggère que le positionnement du centrosome est probablement contrôlé par des facteurs extrinsèques par l'intermédiaire de la stabilisation des microtubules. Cette hypothèse est cohérente avec le fait que de nombreux, sinon tous facteurs de guidage des interneurons corticaux, contrôlent la stabilité des microtubules de façon plus ou moins directe.

## **II Rôle de la myosine II et de la voie Rho dans la migration neuronale**

Premièrement, nous avons démontré que la voie RhoA-ROCK1/2 contrôle l'activation de la myosine II dans les interneurons corticaux en migration et en particulier leur nucléokinèse. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Causeret et coll., qui ont montré que la nucléokinèse des neurones pré-cérébelleux nécessite l'activation de la voie RhoA-ROCK1/2, qui elle-même inhibe la voie Cdc42/Rac1, impliquée dans l'extension neuritique de ces cellules et leur guidage vers une source de nétrine1 (Causeret et al. 2004).

Néanmoins ces études sont en contradiction avec des données qui illustrent le rôle négatif de la voie Rho sur la migration neuronale radiale (Fukushima et al. 2002 ; Hand et al. 2005 ; Nguyen et al. 2006 ; Kolmanskih et al. 2007). L'activation de la myosine IIB est en revanche nécessaire pour assurer la nucléokinèse des interneurons corticaux mais aussi des neurones à migration radiale (Tsai et al. 2007) et des neurones à migration tangentielle de la zone sous-ventriculaire (Shaar et McConnell 2005).

Ainsi, l'activation de la myosine II par la voie Rho qui est nécessaire à la translocation nucléaire des interneurons corticaux ou des neurones pré-cérébelleux, ne semble pas intervenir dans la migration radiale. La participation de la voie Rho à la nucléokinèse des neurones de la zone sous-ventriculaire n'est pas connue.

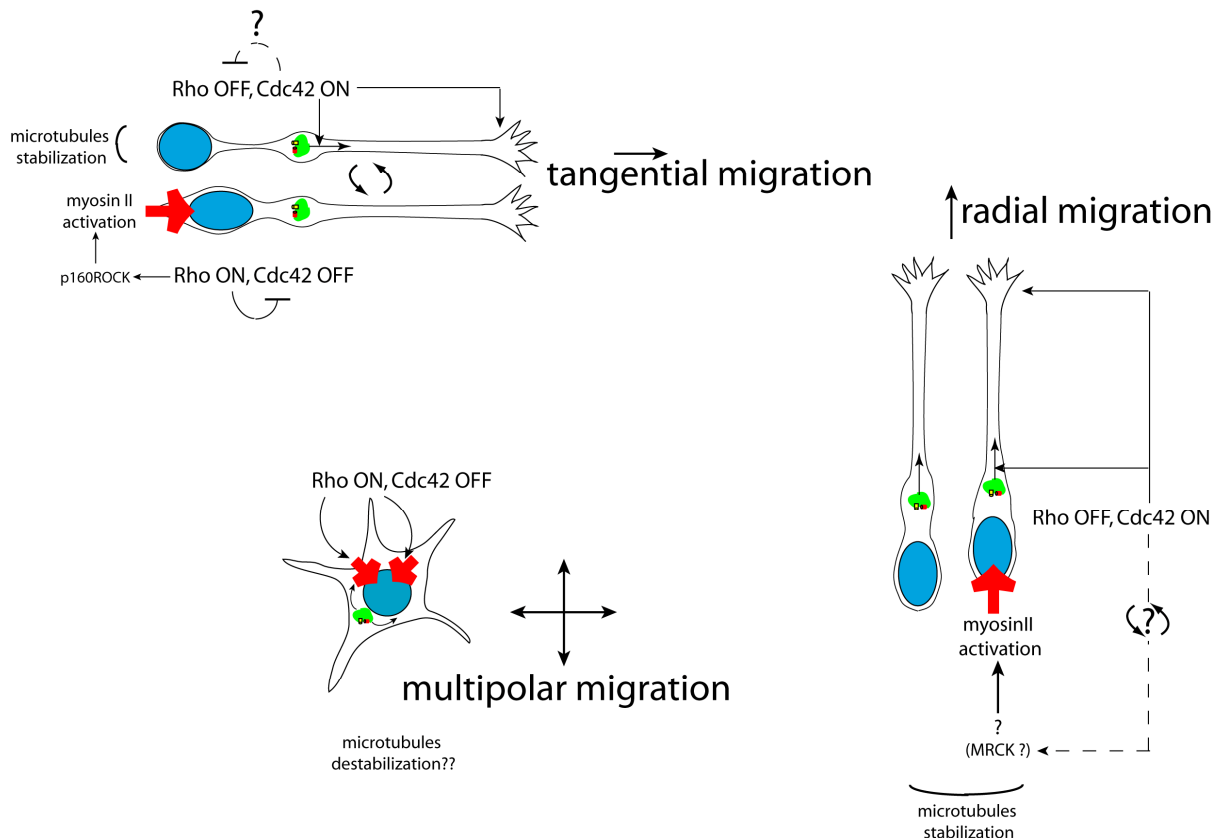
Il semblerait alors que l'activation de la voie RhoA-ROCK1/2 soit nécessaire à la migration neuronale de type tangentiel, mais qu'elle inhibe la migration radiale.

Cette voie RhoA inhibe la voie Cdc42/Rac1 dans les neurones pré-cérébelleux, cette dernière contrôlant la polarisation des neurones en migration radiale. On peut donc imaginer que la voie Rho contrôle de façon cyclique la migration des interneurons corticaux, participant à leur comportement migratoire bi-phasique caractéristique. On peut aussi formuler l'hypothèse que la voie Rho est sur-activée dans la migration multipolaire, comme c'est probablement le cas dans les interneurons corticaux traités avec de fortes doses de nocodazole et qui adoptent alors une morphologie multipolaire (Liu et al. 1998).

Ainsi, si le passage du mode de migration multipolaire au mode de migration bipolaire semble reposer sur l'inhibition de la voie Rho, nous obtiendrions finalement un modèle dans lequel la

voie Rho est OFF dans la migration radiale, ON dans la migration multipolaire et ON/OFF dans la migration tangentielle.

Le contrôle de l'activation de la myosine II dans les types neuronaux qui migrent radialement n'est pas encore élucidé. Peut-être passe-t-il par la kinase MRCK connue pour son rôle dans le positionnement du noyau.



**Fig.95 Schéma hypothétique des rôles des cytosquelettes d'acto-myosine et de microtubules et leur contrôle par les Rho-GTPases Rho et Cdc42 dans les 3 types de migration neuronale.**

Deuxièmement, j'ai pu démontrer que le système d'acto-myosine et la voie Rho qui le régule contrôlent le recouplage du noyau et du centrosome dans les interneurons corticaux en migration.

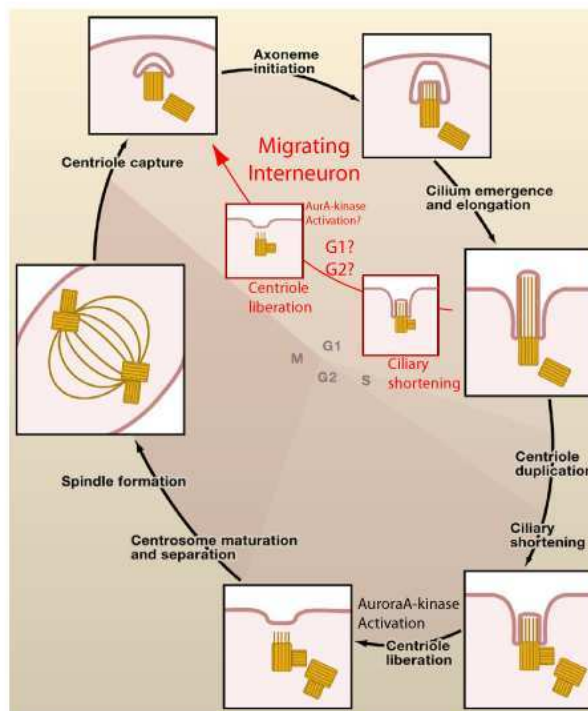
Les mécanismes qui contrôlent le couplage du centrosome et du noyau dans les autres types de neurones en migration restent incompris. La participation des microtubules et des moteurs moléculaires associés semble établie. Ce système participerait au processus de recouplage du noyau et du centrosome. En revanche, le rôle du système d'acto-myosine dans le couplage noyau-centrosome des neurones autres que les interneurons corticaux n'est pas connu à l'heure actuelle (ou plutôt pas considéré pour le moment). En effet, dans les expériences d'inactivation de la myosine II, des neurones en migration radiale, il se produit un défaut du recouplage entre le noyau, bloqué, et le centrosome qui a migré vers l'avant de la cellule. Il apparaît néanmoins que, dans tous les neurones en migration, il existe un cycle de découplage-recouplage entre le noyau et le centrosome (Solecki et al. 2004 ; Schaar et McConnell 2005). Dans ces cellules, le centrosome semble ne pas être stabilisé devant le noyau avant que le noyau ne transloque, comme c'est le cas dans les interneurons corticaux (Tsai et al. 2007). Si le cycle ne s'effectue pas par l'intermédiaire du centrosome, il doit donc alors exister un mécanisme qui cycliquement inhibe l'avancée du noyau dans ces cellules.



Peut-être alors existe-t-il un cycle d'activation de la voie Cdc42/Rac1, si c'est elle qui contrôle les mouvements du noyau. Ce contrôle pourrait en outre être positif comme négatif, car il est aussi possible que ce soit l'inactivation de la voie Cdc42 qui permette au noyau d'avancer. Ceci est peu probable mais la possibilité existe. Il existerait néanmoins alors un lien direct entre la polarisation de la cellule et les mouvements du noyau. Cette hypothèse pour la migration radiale nous pousse à revenir vers les interneurons corticaux : existerait-il un contrôle par la voie Cdc42/Rac1 de l'activation de la myosine II du soma de ces cellules, qui participerait au cycle de recouplage entre le noyau et le centrosome en agissant non plus seulement au niveau du centrosome, comme ce qui est connu, mais aussi au niveau du noyau ? La question est ouverte à de futures expériences.

### III Les interneurons corticaux en migration sont-ils sortis du cycle cellulaire ?

Les interneurons corticaux en migration sont des cellules post-mitotiques, mais pas encore totalement différenciées. Ainsi, il n'est pas évident de définir leur état au niveau du cycle cellulaire. Un neurone différencié est considéré comme une cellule dans un état G0, où la cellule a quitté définitivement le cycle prolifératif et ne se divise plus. Jusqu'à présent aucun argument ne va à l'encontre de cette définition. Les interneurons corticaux seraient alors en phase G0 ou en phase G1 (prêt à entrer en G0) du cycle. Mais le cycle du cil dans une cellule en prolifération illustre bien que la situation est certainement plus complexe. En effet, il semble que les interneurons corticaux présentent un cycle du corps basal, qui, s'il se confirme, est totalement original. D'après les données de la littérature, ce cycle nécessiterait des mécanismes propres à la phase G1 et aux phases S et G2 (Fig.96). Le contrôle et le rôle de ce processus restent énigmatiques.



**Fig.96 Schéma du cycle des centrioles dans les interneurons Corticaux en migration et corrélation hypothétique avec le cycle cellulaire.**  
Adapté de Pan et Snell 2007.

Une piste possible de recherche dans la compréhension des acteurs mis en jeu est la voie de signalisation récemment mise en évidence concernant le décrochage du cil dans une cellule en prolifération. Aurora A est une kinase centrosomale qui régule le cycle cellulaire et qui est active dans de nombreux cancers associés à des amplifications du centrosome et une instabilité génomique. HEF-1 est une protéine d'échafaudage qui active Aurora A, impliquée dans les métastases et impliquée dans les interactions avec la matrice extra-cellulaire par l'intermédiaire des intégrines. L'activation d'Aurora A par HEF-1 est nécessaire et suffisante au processus de résorption du cil primaire, c'est-à-dire au raccourcissement du cil et à son internalisation. Le raccourcissement du cil est effectué par la déacétylase HDAC6 (Pugacheva et al. 2007).

Dans le futur, l'équipe de Christine Métin va tenter de cibler cette voie, par des approches pharmacologiques, pour bloquer la résorption ciliaire dans les interneurons corticaux en migration.

Une autre approche possible serait de viser la protéine IFT88/Polaris (Taulman et al. 2001). En effet, Polaris participe au transport intra-flagellaire et est localisée au centrosome pendant la division cellulaire de cellules non-ciliées, de façon indépendante des microtubules et de la dynéine. La surexpression de Polaris bloque la transition G1/S, et induit une mort cellulaire. En revanche, l'inactivation de Polaris par ARN interférence stimule le passage des phases S, G2 et M. Polaris est ainsi cruciale pour la transition G1/S (Robert et al. 2007), et pourrait représenter un acteur important du contrôle de la migration des interneurons corticaux.

Enfin, la situation dans les neurones est d'autant plus complexe que le complexe p35/Cdk5 est à l'œuvre dans ces cellules. Il participe peut-être également au cycle du corps basal dans les neurones en migration. Certains arguments peut-être un peu éloignés mais présents vont dans ce sens. Ce complexe est trouvé dans les fibres denses du flagelle des spermatozoïdes (Rosales et al. 2004), et il est probablement impliqué dans les poly-cystites rénales (Bukanov et al. 2006). Il serait donc intéressant de rechercher une implication potentielle du complexe p35/Cdk5 dans les interneurons corticaux en migration, et bien que des essais de traitement pharmacologique de ces cellules avec de la roscovitine, inhibiteur de Cdk5, n'ont *a priori* rien donné, une vérification s'impose tout-de-même.

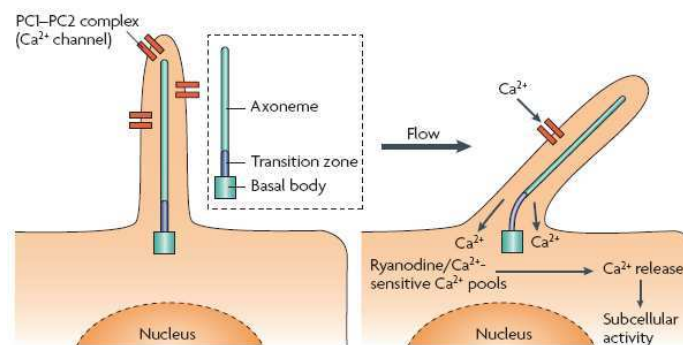
#### **IV Quels sont les rôles possibles du cil primaire dans les interneurons corticaux en migration ?**

La fonction d'un cil est en général de transduire des signaux, qui peuvent être de différentes natures : chimique, mécanique ou photonique. Nous écarterons la transduction photonique, assurée par les photorécepteurs de la rétine qui possèdent des cils différenciés, les cils connecteurs (Liu et al. 1999 ; Pazour et al. 2002).

##### **a- Mécanotransduction ?**

La transduction d'un signal mécanique passe par des canaux calciques localisés dans la membrane du cil : les polycystines 1 et 2. Une déformation du cil, provoquée par un flux liquidien en règle générale, mais qui pourrait ici être due au substrat ou aux cellules environnantes, entraîne une entrée de calcium dans la cellule par l'intermédiaire des polycystines et induit des signalisations dépendantes du calcium (Fig.97). C'est ce qui se passe dans les cellules épithéliales du rein par exemple, où les entrées de calcium régulent la différenciation et le fonctionnement normal de ces cellules. Chez les souris mutantes Tg737,

cette régulation est défectueuse par l'absence de cil fonctionnel, et les reins sont polykystiques (Schwartz et al. 1997 ; Pazour et al. 2000 ; Praetorius et Spring 2001,2003 ; Liu et al. 2005). Dans les fibroblastes 3T3 en migration, l'orientation du cil primaire est parallèle au substrat de migration (Albrecht-Buehler 1977). Ainsi, peut-être le cil permet-il une détection du substrat et un contrôle des remaniements du cytosquelette en fonction de celui-ci. Nous avons pu observer que, dans les interneurons corticaux en migration, le cil adopte le plus souvent une localisation privilégiée, à la base du renflement du côté du noyau, avec une orientation là aussi parallèle au substrat. La signalisation calcique sous la dépendance du substrat par mécano-transduction pourrait dans les interneurons corticaux générer des augmentations importantes et transitoires de la concentration intra-cellulaire en calcium. Un argument fort pour supporter cette hypothèse est que la translocation nucléaire dans les interneurons corticaux en migration est précédée d'une augmentation transitoire de la concentration intracellulaire en calcium dans la région du centrosome (Moya et Valdeolmillos 2004).



**Fig.97 La signalisation par mécanostimulation du cil.**  
(Fliegauf et al. 2007)

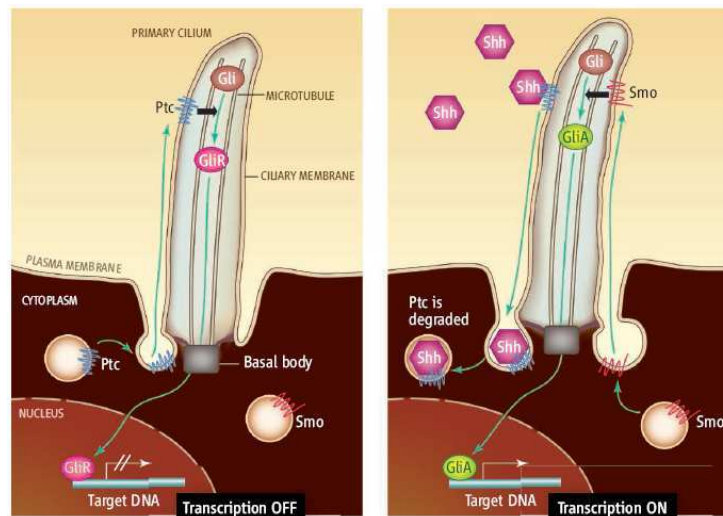
En outre, dans les neurones sensoriels du nématode *C.elegans* les cils sont impliqués dans la perception de l'osmolarité du milieu environnant (Tobin et al. 2002). Le cil des interneurons corticaux en migration est donc peut-être lui aussi impliqué dans la détection de l'osmolarité du milieu environnant.

Le cil primaire des interneurons corticaux en migration pourrait assurer une chimio-transduction, par exemple de neurotransmetteurs, en particulier de la somatostatine ou de la sérotonine, si l'on considère les récepteurs portés par les neurones différenciés. Mais il est maintenant bien établi que le cil primaire assure la transduction de signaux très importants pour la morphogénèse et la différenciation cellulaire au cours du développement, et que des défauts de ces signalisations chez l'adulte pourraient être impliqués dans de nombreux cancers.

### **b- Transduction de la voie Shh ?**

Des défauts de signalisation de la voie Shh entraînent des malformations congénitales de type holoprosencéphalie, polydactylie, des malformations craniofaciales et des malformations du squelette (McMahon et al. 2003 ; Huangfu et Anderson 2006). Ces défauts ressemblent aux défauts observés chez le mutant Tg737/Polaris (Murcia et al. 2000 ; Zhang et al. 2003) et à ceux observés dans bon nombre de ciliopathies humaines (Fliegauf et al. 2007). Ceci est dû au fait que la machinerie du transport intra-flagellaire (IFT) est essentielle à la signalisation de

Shh (Fig.98). Un cil bien structuré est en effet une condition nécessaire à la signalisation de Shh et la régulation des facteurs de transcription Gli (Caspary et al. 2007).



**Fig.97 Transduction du signal Shh par le cil primaire.**  
(Christensen et Ott 2007)

En particulier, le cil primaire permet d'adresser les protéines Gli et SU FU au sommet du cil. En l'absence de Shh, le récepteur Patched1 (Ptc1) exerce une inhibition sur le récepteur Smoothened (SMO), ce qui permet le clivage de Gli3 en sa forme répressive GLi3. GLi3 est alors transporté par les dynéines jusqu'au noyau où il peut exercer son contrôle transcriptionnel. La liaison de Shh sur Ptc1 induit la levée de l'inhibition sur SMO et inhibe le clivage de Gli3, qui peut alors être transporté jusqu'au noyau et y activer la transcription de gènes cibles (Fig.98).

La signalisation Shh pourrait stimuler ou inhiber la migration des interneurons corticaux. En effet, Shh contrôle la migration de nombreux types cellulaires :

- Shh stimule ou inhibe la migration axonale (Charron et al. 2003 ; Kolpak et al. 2005) ;
- Shh bloque la migration des cellules de crête neurale chez le poulet ;
- Shh est nécessaire pour la migration des cellules germinales et de la trachée chez la drosophile (Testaz et al. 2001 ; Deshpande et al. 2001 ; Kato et al. 2004) ;
- Shh stimule la migration de cellules endothéliales (Hochman et al. 2006).

Parmi les gènes fortement exprimés après stimulation par Shh dans les cellules endothéliales, on trouve les gènes Gli1 et Patched1, mais aussi la Neuropiline1 (Nrp1), qui assure une répulsion sur les interneurons corticaux en migration dans le télencéphale basal (Hochman et al. 2006).

Il a de plus été montré que la migration des progéniteurs hors de la couche granulaire externe du cervelet (EGL External Granule Layer) stimule la transition d'un état prolifératif vers un état non-prolifératif, migratoire, et la réponse différentielle à Shh des cellules dans l'EGL et hors de l'EGL pourrait être responsable de ces transitions d'états (Choi et al. 2005). Enfin, récemment, une nouvelle voie de signalisation de Shh a été mis-en-évidence, passant par le récepteur *Smoothened* et indépendante des facteurs de transcription Gli. Cette voie induit des remaniements du cytosquelette de fibroblastes en culture et la formation de lamellipodes. Ces modifications morphologiques sont associées à une stimulation de la migration en réponse à Shh (Bijlsma et al. 2007).

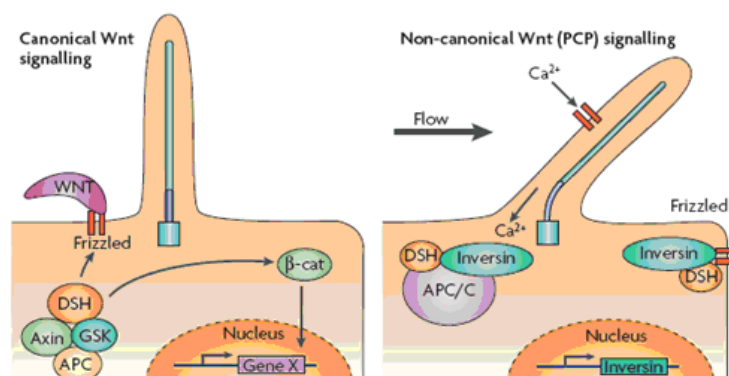
Pour explorer le possible contrôle par la voie Shh de la migration des interneurons corticaux, l'équipe de Christine Métin va tenter de stimuler ou d'inhiber la voie Shh, en réalisant des expériences *in vitro* de stimulation des interneurons corticaux par du Shh recombinant, et réaliser un blocage de la voie Shh à l'aide d'anticorps.

### c- Transduction des voies Wnt ?

Les souris qui présentent des défauts des protéines de l'IFT, et des mutations des gènes du syndrome de Bardet-Biedl (BBS Bardet-Biedl Syndrom) Bbs1, Bbs4 et Bbs6, présentent des phénotypes qui ressemblent à ceux observés chez des mutants de la voie Wnt non-canonique (ou voie PCP pour Planar Cell Polarity) de polarité dans le plan. Ces défauts rassemblent entre autres des défauts du tube neural et des stéréocils de la cochlée (Torban et al. 2004). La voie de signalisation Wnt est divisée en deux voies de transduction, la voie canonique et la voie non-canonique, qui entraînent des cascades de signalisation distinctes (Fig.99). La voie canonique cible la  $\beta$ -caténine, alors que la voie non-canonique PCP passe par la protéine membranaire Van Gogh-like 2 (Vangl2/Strabismus). La voie PCP participe à l'établissement de la polarité dans le plan d'une couche cellulaire, en contrôlant la migration cellulaire ou l'orientation du fuseau mitotique (Klein et Mlodzik 2005).

L'inversine est une protéine qui localise au cil primaire des cellules épithéliales du rein (Morgan et al. 2002), de fibroblastes en culture et dans la glande pituitaire. Cette protéine est impliquée dans les pathologies avec rein polykystique (Morgan et al. 2002 ; Otto et al. 2003). L'inversine fonctionne comme un interrupteur moléculaire entre ces deux voies (Simons et al. 2005), en induisant la dégradation de la protéine Dishevelled ; l'inversine inhibe la voie canonique et stimule la voie non-canonique. La mécanostimulation du cil augmente la quantité d'inversine sur le cil primaire, et ainsi stimule la voie non-canonique au détriment de la voie canonique. Ainsi, l'inactivation de KIF3A qui affecte la ciliogenèse induit dans les tubules rénaux une augmentation de la  $\beta$ -caténine, de la prolifération cellulaire et de fait la formation de kystes (Lin et al. 2003). Enfin, la voie Polycytines/calcium et les voies Wnt interagiraient pour contrôler par exemple l'adhérence et la migration cellulaire durant la gastrulation (Habas et Dawid 2005), de même que la voie PCP et la voie Shh (Park et al 2006), ce qui suggère de nombreuses interactions entre les voies de signalisation initiées par le cil primaire.

Ainsi, le cil primaire des interneurons corticaux en migration permet peut-être d'établir une signalisation de la voie des Wnts, qui pourrait contrôler les processus de migration et de différenciation de ces cellules.



**Fig.99 Les voies de signalisation canonique et non-canonique des Wnts.**  
(Fliegauf et al. 2007)



Ajoutons finalement dans ce chapitre que le cil pourrait aussi être un moyen de concentrer du matériel et de le libérer dans le milieu extra-cellulaire, comme illustré pour les cellules neuroépithéliales avec la prominine-1 (Dubreuil et al. 2007).

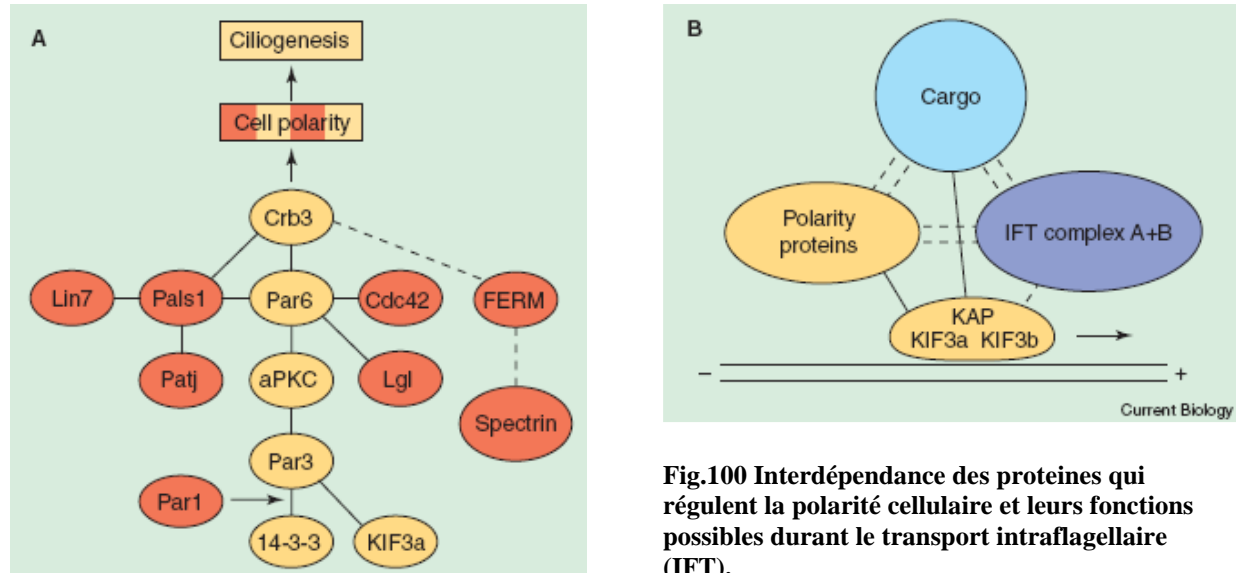
## V Migration, ancrage du corps basal et polarité dans les interneurons corticaux en migration

Le complexe de polarité qui comprend la protéine transmembranaire Crb3 et la protéine atypique Pals1 est impliqué dans la polarité des cellules épithéliales de mammifères (Roh et al. 2003 ; revue par Margolis et Borg 2005). Ce complexe interagit avec le complexe Par3-Par6-PKC $\zeta$  dans les épithéliums (Hurd et al. 2003 ; Nelson 2003), et cette interaction est requise pour assurer la ciliogenèse, par l'intermédiaire du moteur antérograde KIF3 qui participe au trafic intra-ciliaire (Intra Flagellar Transport IFT ; Fan et al. 2004).

De telles associations entre des déterminants de la polarité cellulaire et la machinerie de la ciliogenèse permettent de spéculer que ces complexes de la polarité fournissent des signaux à la migration des centrioles.

De plus, la fonction du complexe de polarité PAR3-PAR6-PKC $\zeta$  dépend de sa localisation sub-cellulaire dans une cellule polarisée, et en particulier dans les neurones.

Par3 et la PKC $\zeta$  s'accumulent à l'extrémité des axones en croissance dans des cultures de neurones hippocampiques de rat, par un processus qui s'effectue par l'intermédiaire de la protéine KIF3A. L'expression de dominant-négatifs de PAR3 ou KIF3A inhibe l'accumulation de PAR3 et PKC $\zeta$  à l'extrémité des neurites et la polarisation des neurones (Nishimura et al. 2004).



**Fig.100 Interdépendance des protéines qui régulent la polarité cellulaire et leurs fonctions possibles durant le transport intraflagellaire (IFT).**

A- Schéma des interactions physiques entre protéines impliquées dans l'établissement de la polarité chez les vertébrés (ligne brisée chez la drosophile). Protéines en rouge et en jaune impliquées dans la polarité, et celles en jaune impliquées en plus dans la ciliogenèse.

B- Des protéines de la polarité cellulaire et des protéines de l'IFT se lient à des cargos cytoplasmiques, et la kinésine II (KIF3A-KIF3B-KAP) peut se lier directement à des protéines de la polarité, à des cargos vésiculaires et aux complexes de l'IFT.

(Bossinger et Bachmann 2004)

Ainsi, il existe un lien entre la mise en place de la polarité dans les neurones en différenciation et des protéines impliquées dans la ciliogenèse (Fig.100). Le contrôle de la polarité des neurones en migration est donc peut-être liée à la ciliogenèse des neurones en différenciation (non explorée jusqu'à aujourd'hui mais peut-être étudiée dans le futur).

Dans les neurones corticaux en migration, le complexe de polarité Par3-Par6-PKC $\zeta$  localise au niveau du centrosome, lequel possède un corps basal intra-cytoplasmique (Hatten et al. 1984 ; Gregory et al. 1988) ou ancré à la membrane plasmique (Rakic 1971 ; Schaar et McConnell 2005). Ainsi, il existe peut-être dans les neurones en migration un processus de ciliogenèse avorté, ou bien 'en cours', qui permet à la cellule de se polariser par l'intermédiaire de complexes de polarité en rapport avec le corps basal. Ceci permettrait d'établir un transport dirigé dans la direction du corps basal et du front avant en croissance pour fournir le matériel nécessaire à la pousse neuritique. Peut-être les états ancrés vs non-ancrés du corps basal corréleraient-ils avec des activités différentes des complexes de polarité. Ainsi le degré de polarité du neurone en migration suivrait le degré de ciliogenèse dans ces cellules. Si l'on suit cette hypothèse, alors des cellules qui n'inversent pas leur polarité devraient contenir un corps basal ancré à la membrane plasmique, et inversement, dans les cellules qui inversent souvent leur polarité, comme les neurones en migration multipolaire, on devrait trouver une majorité de corps basaux enfouis dans le cytoplasme, car la polarité ne serait pas suffisamment stabilisée.

Il apparaît à la vue de nos résultats que dans les interneurons corticaux en migration, le corps basal est capable de s'ancrer cycliquement à la membrane plasmique, et d'alterner des localisations intra-cytoplasmiques et membranaires. Il y a alors ici une probable corrélation entre le comportement migratoire de ces cellules et le cycle du corps basal.

En effet, ces cellules présentent un cycle migratoire particulier, dans lequel

- 1) le centrosome migre dans le neurite de tête, avec un allongement des neurites et
- 2) le noyau transloque, avec éventuellement une division des cônes de croissance.

Le centrosome 'porte' des complexes de polarité (Solecki et al. 2004). Si l'on suppose que la polarisation d'un neurone en migration est assurée d'une part au niveau de ses cônes de croissance, et d'autre part au niveau du centrosome, et si l'on corréle le comportement migratoire des interneurons corticaux à la localisation du corps basal, on peut alors imaginer que l'on aurait un cycle avec :

- 1) migration du centrosome-corps basal vers l'avant, avec une polarité de la cellule qui est en remaniement (qui n'est pas figée). Les neurites s'allongent pendant ce temps-à, permettant simplement à la cellule de continuer sa migration.
- 2) le corps basal s'ancre à la membrane lorsqu'une branche est choisie, la polarité est figée, un axonème émerge alors pour former le cil ; du matériel peut être acheminé vers l'avant de façon dirigée, ce qui permet de stabiliser le branche choisie, puis
- 3) le noyau transloque, ce qui entraînerait ou serait dû à la division des cônes de croissance ; le corps basal se décrocherait alors de la membrane plasmique, et un nouveau cycle pourrait avoir lieu.

L'étude de la migration d'interneurones défectueux pour la fonction du cil et/ou l'ancrage du corps basal à la membrane plasmique, comme les cellules mutantes KIF3A, pourraient ouvrir des pistes pour comprendre le rôle du cil dans le processus de migration *per se* des interneurons et de vérifier ces hypothèses.

## ***ANNEXES***

# Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from *doublecortin* knockout mice

Caroline Kappeler<sup>1,3,4,5</sup>, Yoann Saillour<sup>1,3,4,5,†</sup>, Jean-Pierre Baudoin<sup>6,†</sup>,  
Françoise Phan Dinh Tuy<sup>1,3,4,5</sup>, Chantal Alvarez<sup>6</sup>, Christophe Houbron<sup>2,3,4,5</sup>, Patricia Gaspar<sup>6</sup>,  
Ghislaine Hamard<sup>2,3,4,5</sup>, Jamel Chelly<sup>1,3,4,5</sup>, Christine Métin<sup>3</sup> and Fiona Francis<sup>1,3,4,5,\*</sup>

<sup>1</sup>Département de Génétique et Développement and <sup>2</sup>Homologous Recombination Laboratory, Institut Cochin, F-75014 Paris, France, <sup>3</sup>INSERM U567, Paris, France, <sup>4</sup>CNRS UMR 8104, Paris, France, <sup>5</sup>Université Paris 5, Faculté de Médecine René Descartes, UM 3, 75014 Paris, France and <sup>6</sup>U616 INSERM, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 47, Bld de l'Hôpital, 75651 Paris Cédex 13, France

Received January 04, 2006; Revised and Accepted March 10, 2006

**Type I lissencephaly results from mutations in the *doublecortin* (*DCX*) and *LIS1* genes. We generated *Dcx* knockout mice to further understand the pathophysiological mechanisms associated with this cortical malformation. *Dcx* is expressed in migrating interneurons in developing human and mouse brains. Video microscopy analyses of such tangentially migrating neuron populations derived from the medial ganglionic eminence show defects in migratory dynamics. Specifically, the formation and division of growth cones, leading to the production of new branches, are more frequent in knockout cells, although branches are less stable. *Dcx*-deficient cells thus migrate in a disorganized manner, extending and retracting short branches and making less long-distant movements of the nucleus. Despite these differences, migratory speeds and distances remain similar to wild-type cells. These novel data thus highlight a role for *Dcx*, a microtubule-associated protein enriched at the leading edge in the branching and nucleokinesis of migrating interneurons.**

## INTRODUCTION

Malformations of cortical development are responsible for a large proportion of cases of mental retardation and epilepsy in children (1). Type I lissencephaly is one such disorder characterized by a smooth brain surface (agyria) and a severely disorganized cortex. This consists of four jumbled layers of neurons, instead of the six highly organized layers present in a well-formed brain (2). Molecular studies have revealed that the *LIS1* and *doublecortin* (*DCX*) genes are mutated in a proportion of cases for this disorder (3–5). Nevertheless, the primary pathophysiological mechanisms underlying type I lissencephaly still remain to be elucidated.

The correct lamination of the cortex is dependent on highly regulated neuronal migration. Radial migration (6), principally

used by excitatory pyramidal neuron precursors, occurs in an orientation perpendicular to the ventricular surface. Waves of radially migrating neurons thus migrate from the ventricular zone where they are produced to the superficial regions of the cortex, where they progressively form the cortical layers. Tangential modes of migration are also important for cortical development. Thus, inhibitory neuron (interneuron) precursors in rodents are known to be generated in an extra-cortical structure, the medial ganglionic eminence (MGE) and to migrate tangentially into the neocortex in specific migratory streams (7–9). Arriving in the cortex, such cells then use radial migration in order to integrate into the different cortical layers. The exact migratory substrates for tangential migration are still unknown (9). Type I lissencephaly is believed to be a neuronal migration disorder, involving a disorganization

\*To whom correspondence should be addressed at: Institut Cochin, Faculté de Médecine Cochin Port Royal, 24 rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France. Tel: +33 144412429; Fax: +33 144412421; Email: francis@cochin.inserm.fr

†These authors contributed equally.

of both pyramidal neurons and interneurons (10,11). Interestingly, in human, a proportion of interneurons are produced in the cortical ventricular zone and presumably use mainly radial modes of migration to reach their final destination (12). Massive defects in radial migration are thus probable in type I lissencephaly, although it is unclear if abnormal tangential migration also contributes to this phenotype.

*Lis1* and *Dcx* knockout (KO) mice have been produced and remarkably, in each case the lamination of the mouse neocortex was found to be relatively normal (13–16). *Lis1* heterozygotes, equivalent thus to the human heterozygous state giving rise to severe lissencephaly, show apparently only minor abnormalities of radial migration in the cortex by bromodeoxyuridine (BrdU) labelling studies. Similar abnormalities in tangential migration were also demonstrated later in *Lis1* (+/–) embryonic brains *in vivo* and *in vitro*, by immunohistochemistry, and lipophilic dye labelling of migrating cells in slice cultures (17). Although tangential migration was not assessed in *Dcx* KO mice (15), analyses of radial migration showed no major abnormalities in this model. However, RNAi studies have also been performed for *Dcx* in rat and mouse (18,19). In these studies, defects were observed in radially migrating neurons, but interestingly, this phenotype was more dramatic in the rat than in the mouse. These data suggest that *Dcx*'s neuronal function may have become increasingly important with increased brain size.

*Dcx*, expressed both in radially and tangentially oriented neurons in mouse brain (20,21), shows a predominant expression in tangentially oriented neurons in human fetal brain (10). Thus *DCX* seems likely to be particularly important for tangential migration in human. In both mouse and human, *DCX/Dcx* is also strongly expressed in growing axons and dendrites. Interestingly, an enrichment of *Dcx* has been shown at the extremities of growing processes in differentiating neurons and certain migrating neurons in culture (20,22,23), suggesting that this protein is required for process growth. In fitting with this, *Dcx* has been shown to nucleate and stabilize microtubules, important functions in this region of the cell (20,21,24). Its subcellular localization and function may, however, be regulated by phosphorylation (22,23,25) and thus *Dcx* may have various functions at different subcellular localizations (26).

In order to further elucidate *Dcx* function during migration, we focused on tangentially migrating interneuron precursors derived from *Dcx* KO mice. The migration dynamics of wild-type (WT) cells originating from the MGE have been well characterized previously (27–29). Such cells normally extend a leading process tipped with a growth cone in the direction of migration. Nuclear translocation into the leading process and retraction of a trailing process at the cell rear allow the cell to advance. Using slice cultures, we observed that *Dcx* KO cells show more branching compared with WT cells. Using an *in vitro* migration model recently used to characterize the dynamics of nuclear movement and its correlation with branch production in MGE cells (30), we were able to determine by video microscopy experiments that a higher proportion of KO cells have a more branched neuritic arbour compared with WT and that nuclear translocation is also perturbed. Individual KO MGE cells thus migrate in a less organized manner, dynamically extending and retracting

short branches and making less long-distant nuclear jumps, although speeds of migration and migratory streams in brain sections seem unchanged. The rostral migratory stream (RMS), however, containing a different population of tangentially migrating interneuron precursors, is abnormal in KO brain sections. Combined, these novel data confirm a role for *Dcx* in tangential migration and provide insights into the function of *Dcx* in migrating cells.

## RESULTS

### Generation of *Dcx* KO mice

Mice carrying a tri-lox P floxed *Dcx* allele with lox P sites inserted upstream and downstream of *Dcx* exon 3 and a PGK-*neo* selection gene (Fig. 1A) were generated following standard procedures and crossed with *Meu-Cre* 40 transgenic mice expressing Cre ubiquitously early in development (31). The partial or complete action of the Cre recombinase led to the generation of KO mice with a deletion of both *Dcx* exon 3 and the selection gene; and mice deleted for the selection gene but conserving a floxed exon 3. KO mice were successively crossed with either C57BL/6 or Sv129*Pas* mice.

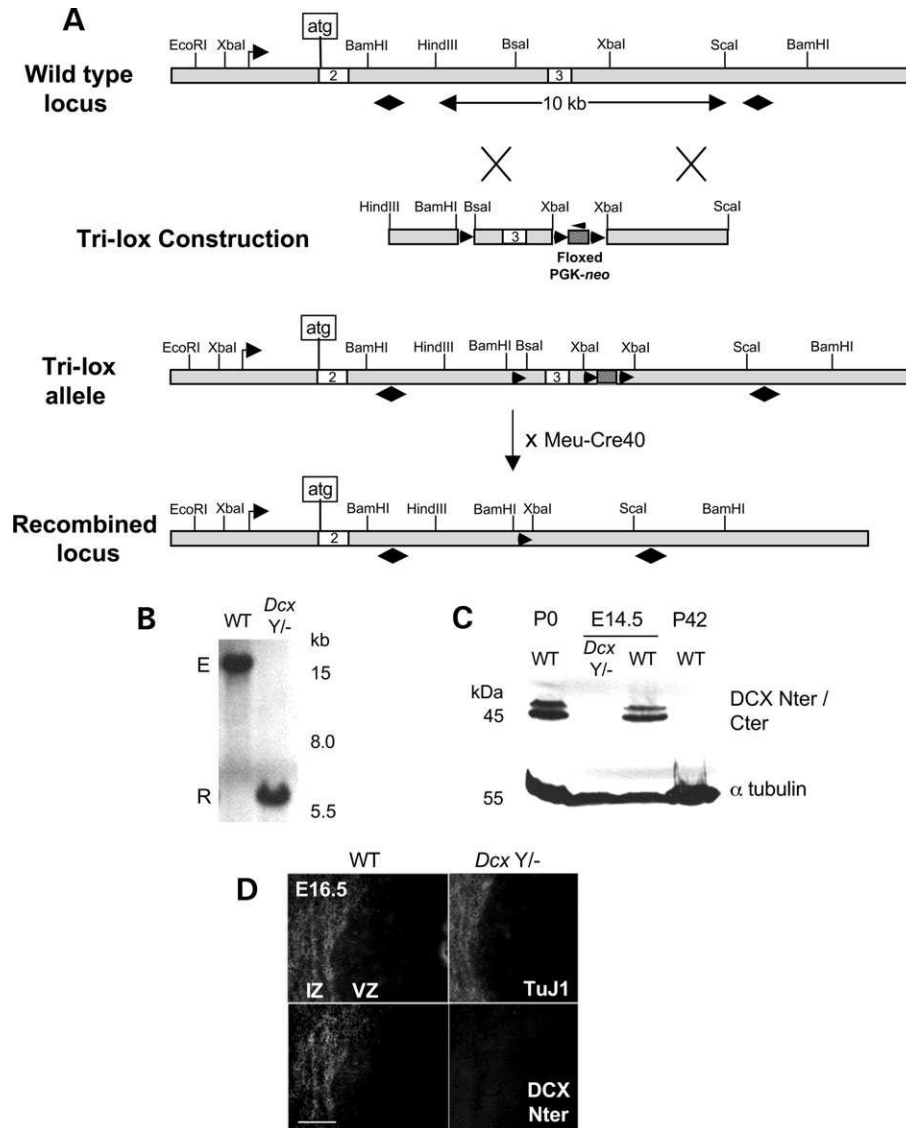
Deletion of exon 3 in mutant KO mice was confirmed by Southern and western blotting (Fig. 1B and C) and immunohistochemistry (Fig. 1D). No *Dcx* protein was observed using antibodies directed at either the N or C terminus of the protein. Mutant hemizygote males (due to the fact that the *Dcx* gene is localized on the X chromosome) and homozygote females were born in the correct ratios, ruling out that a complete absence of *Dcx* is lethal in mouse. Both male hemizygote and female homozygote mice were fertile, thus differing from the *Dcx* mouse model described by Corbo *et al.* (15), where hemizygote males were variably fertile.

### *Dcx* KO mice have no obvious radial migration abnormalities

Histological and immunohistochemical experiments showed no major defects in pyramidal cell generation and migration in the neocortices of KO mouse embryos on both genetic backgrounds. Cortical pyramidal cell neurogenesis occurs between E11 and E17 in the mouse. We, therefore, examined sagittal and coronal sections from embryos at E13.5, E14.5, E16.5, E17.5, E18.5 and newborn mouse brains. In each case, the thickness of the neocortex and the different developmental compartments appeared similar in KO and WT embryos or pups from the same litter. We tested a variety of cortical markers (reelin, microtubule-associated protein 2, nestin, chondroitin sulphate proteoglycan,  $\beta$ III tubulin and aristaless-related homeobox gene) to assess the different zones (preplate, marginal zone, cortical plate, intermediate zone and ventricular zone) and the radial organization of the developing cortex, without observing major differences in the KO (Fig. 2A–C and data not shown). Thus, the proliferation, organization and differentiation of future pyramidal neurons in the neocortex appear largely normal in the mutant mice.

We also performed injections of BrdU during the time period of cortical neurogenesis and migration. BrdU is incorporated

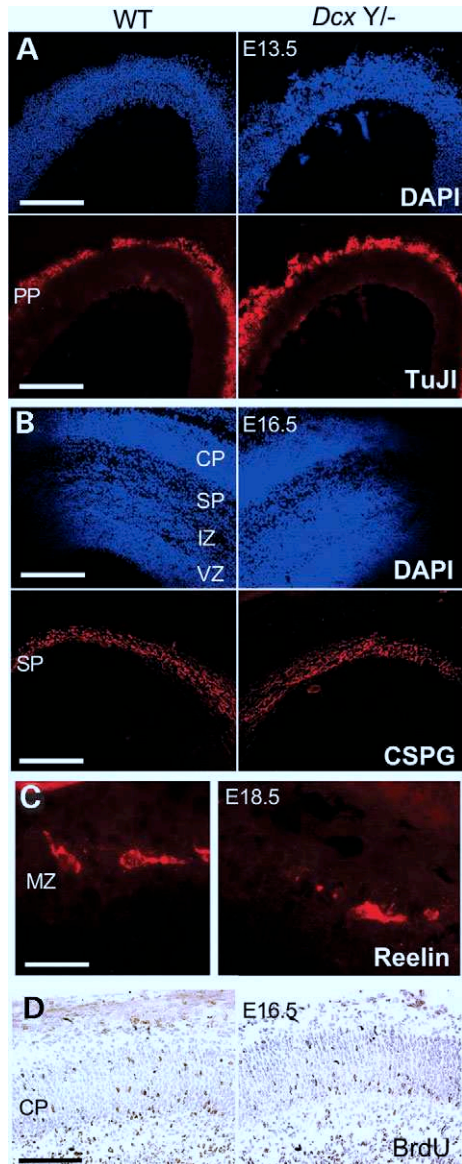




**Figure 1.** *Dcx* construct leading to an absence of Dcx protein in KO mice. (A) A targeting construct was generated containing three lox P sites: upstream and downstream of *Dcx* exon 3 and downstream of a PGK-*neo* selection cassette (shown as arrowheads within the construction). A *Bam*HI site was inserted upstream of the first lox P site. This construct was electroporated in ES cells and clones were verified for correct insertion into the *Dcx* locus. Black horizontal diamonds 5' and 3' of the cloned region represent the hybridization probes used to identify the recombined allele. A mouse line carrying this tri-lox P allele was established and these mice were crossed with transgenic mice expressing the Cre enzyme early in development [Meu-Cre-40 (31)]. Site-specific recombination between the first and third lox P sites led to the deletion of *Dcx* exon 3 and the selection cassette. (B) Southern blotting was used to verify the presence of the recombined allele. A *Bam*HI digest and use of the 5' hybridization probe showed a smaller recombined fragment (R) in KO mice (*Dcx*<sup>Y/-</sup>) compared with WT. E, endogenous fragment. (C) Western blotting showed the absence of Dcx protein in KO mouse embryos. The Dcx protein doublet (20) is present in whole embryonic E14.5 and whole brain P0 WT samples but absent in the E14.5 KO mouse sample. Dcx is no longer expressed in WT adolescent (P42) mouse brain. Detection of  $\alpha$ -tubulin was used as a control to verify the relative quantities of protein in each lane. (D) Immunofluorescence experiments performed using E16.5 coronal brain sections showed an absence of Dcx protein (lower panel) in the cortex of KO (*Dcx*<sup>Y/-</sup>) mouse sections (lower right image). Detection of class III  $\beta$ -tubulin (upper panel) using TuJ1 antibodies was performed as a control on the same sections. Scale bar, 100  $\mu$ m. Dcx and class III  $\beta$ -tubulin do not label proliferating cells in the ventricular zone (VZ). IZ, intermediate zone.

into dividing cells and their progeny and allows an assessment of migrating cells generated at different timepoints. Injections were performed at E11.5, E14.5, E15.5 and E17.5, and in each case embryos were sacrificed either 30 min or 48 h later, or in postnatal stages. These experiments were thus designed to assess cell proliferation (30 min), short-term (48 h) or long-term (postnatal) neuronal migration. Observations of BrdU-positive cells showed no obvious defects in cell proliferation

in the neocortex and no inversion of the neocortical layers. Specifically, we observed that migrating neurons born at E14.5 were able to cross through the previously formed neuronal layers in the cortical plate similar to WT neurons (Fig. 2D). Quantification of the numbers of BrdU-labelled cells in each zone of the developing cortex showed no significant differences between mutant and WT cortex (data not shown), similar to the previously described *Dcx* KO model (15).



**Figure 2.** No obvious abnormalities in the radial organization of the cortex are observed in *DcxY/-* mice. (A) Class III  $\beta$ -tubulin staining (TuJ1) of the preplate (PP) at E13.5 shows a similar staining pattern in WT and *DcxY/-* embryos. (B) Chondroitin sulphate proteoglycan (CSPG) staining reveals a normal subplate (SP) beneath the cortical plate (CP) at E16.5. The general organization of the developing cortex, shown by DAPI nuclear staining, appears similar in the WT and KO embryos. VZ, ventricular zone; IZ, intermediate zone. (C) Reelin staining of Cajal Retzius cells in the marginal zone (MZ) shows an apparently normal morphology of these cells in KO embryos. (D) A BrdU injection at E14.5 with sacrifice at E16.5 shows BrdU-positive nuclei (brown) within the cortical plate, suggesting that migrating neurons can cross the already established cell layers to reach more superficial layers. Quantitative analyses of such sections showed no obvious differences between WT and KO sections, neither in the number or in the distribution of labelled cells nor in the total number of cells in each cortical zone. Sections were counterstained with Hemalun Mayer. Scale bars, 250  $\mu\text{m}$  (A, B), 40  $\mu\text{m}$  (C) and 100  $\mu\text{m}$  (D).

### Increased branching of interneuron precursors in slice cultures

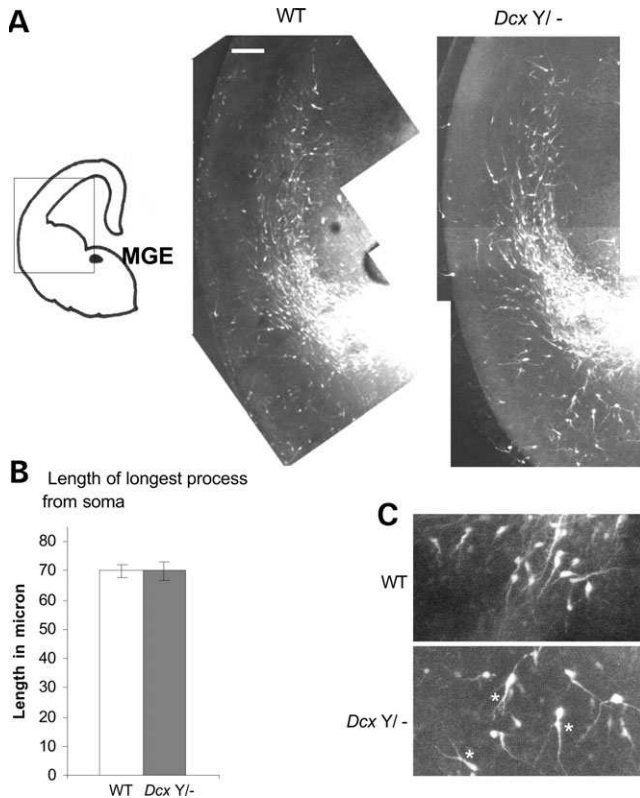
The expression of DCX in tangentially oriented neurons in the developing mouse and human brain (10,20,22) led us to

question whether migration abnormalities exist in these cells in *Dcx* KO mice. During mouse embryogenesis, tangentially migrating interneuron precursors are mainly generated between E12.5 and E14.5 in the MGE far away from the neocortex (32,33), and as such, are amenable to detailed studies of migration because of their localized production and the long distances they travel before reaching their final destination. At late stages of corticogenesis, *Dcx*-positive tangentially migrating neurons have been previously observed in the subventricular zone (SVZ), consistent with the expression of this protein in cells most likely derived from the MGE (20). Nevertheless, the role of *Dcx* during the migration of such cells has not previously been analysed.

We set out therefore to analyse such tangentially migrating cells derived from the MGE using well-characterized, organotypic slice cultures, containing both the MGE and the cortex (32,33). Three main tangential migratory routes have been recognized (9), a superficial route through the marginal zone, a second route in the intermediate zone and a third deeper route in the SVZ. Slice cultures are useful for assessing these pathways, as well as migration distances, and for observing cell orientation and general migratory morphology. Coronal slices were thus prepared from E13.5 and E14.5 KO and WT embryonic brains and cells were labelled by the injection of 5-chloro-methyl-fluorescein diacetate (CMFDA) dye into the MGE (Fig. 3A). Slices were cultured for 48 h and fixed before analysis by confocal microscopy and Metamorph software, with the investigator blind to the genotypes. No major differences were initially detected, neither in the distance migrated by MGE cells, nor in their distribution in the major migratory streams, nor in the overall length of cell processes (Fig. 3B, WT,  $70.10 \pm 2.25 \mu\text{m}$ ,  $n = 16$ , KO,  $70.01 \pm 3.23 \mu\text{m}$ ,  $n = 11$ ). However, in all three experiments performed, the branching of cells was more apparent in KO slices compared with WT, as demonstrated in Fig. 3C, suggesting potential branching abnormalities. Indeed, it is known that during migration, MGE cells produce branches at their leading edge and show a saltatory progression of their nucleus in these branches (27–29,34). Flat co-cultures have shown moreover that leading growth cone divisions create paired branches that lengthen and pause prior to the selection of one branch to become the new leading process and the second branch for retraction (30,35). Thus, the regulation of branching is an important part of MGE cell migration. *Dcx* is in fact a microtubule-associated protein known to stabilize microtubules (20,21,24), the effect of which might therefore normally restrain a growing neuronal process from forming superfluous side branches. Thus, a potential branching phenotype in the absence of *Dcx* may indeed be in fitting with its proposed cellular functions and we thus decided to analyse this further.

### Quantification of the branching abnormalities using video microscopic analyses

The neuritic arbour being difficult to analyse accurately in the complex 3D environment of slice preparations, we thus decided to continue our analyses in comparable co-culture models where the MGE cells are permitted to migrate on a flat surface. Indeed, it has previously been shown that the



**Figure 3.** Migration of *Dcx* KO MGE cells in slice cultures reveals increased branching. (A) Reconstructed confocal images of WT and *DcxY*<sup>-/-</sup> coronal slices. As shown schematically on the left, a fluorescent dye was injected into the MGE of E13.5 coronal slices taken from a *DcxY*<sup>-/-</sup> mouse brain and a WT littermate control. The boxed area indicates the region where confocal microscope images were captured. Reconstructions of images corresponding in each case to one coronal slice show that the distance migrated is similar between the WT and *DcxY*<sup>-/-</sup> genotypes. A similar result was obtained at E14.5. This experiment was repeated three times and slices examined for each animal at different rostral–caudal positions, with the investigator blind to the genotypes. Scale bar, 100  $\mu$ m. (B) The morphology of fluorescently labelled cells was examined by confocal microscopy and process length analysed using Metamorph software. For each cell, the total length of the longest process was measured extending from the soma to the terminal growth cone. As shown in the histogram, no differences in total process length were observed in *DcxY*<sup>-/-</sup> cells (grey bar) compared with WT (white bar). Complexity of the neurite was not taken into account in this analysis. (C) Higher magnifications of the slices show an example of the morphology of cells in WT and *DcxY*<sup>-/-</sup> slices. During the Metamorph analyses, a global impression of more branched cells (marked by white asterisks) was noted for the *DcxY*<sup>-/-</sup> slices, with the investigator blind to the genotypes.

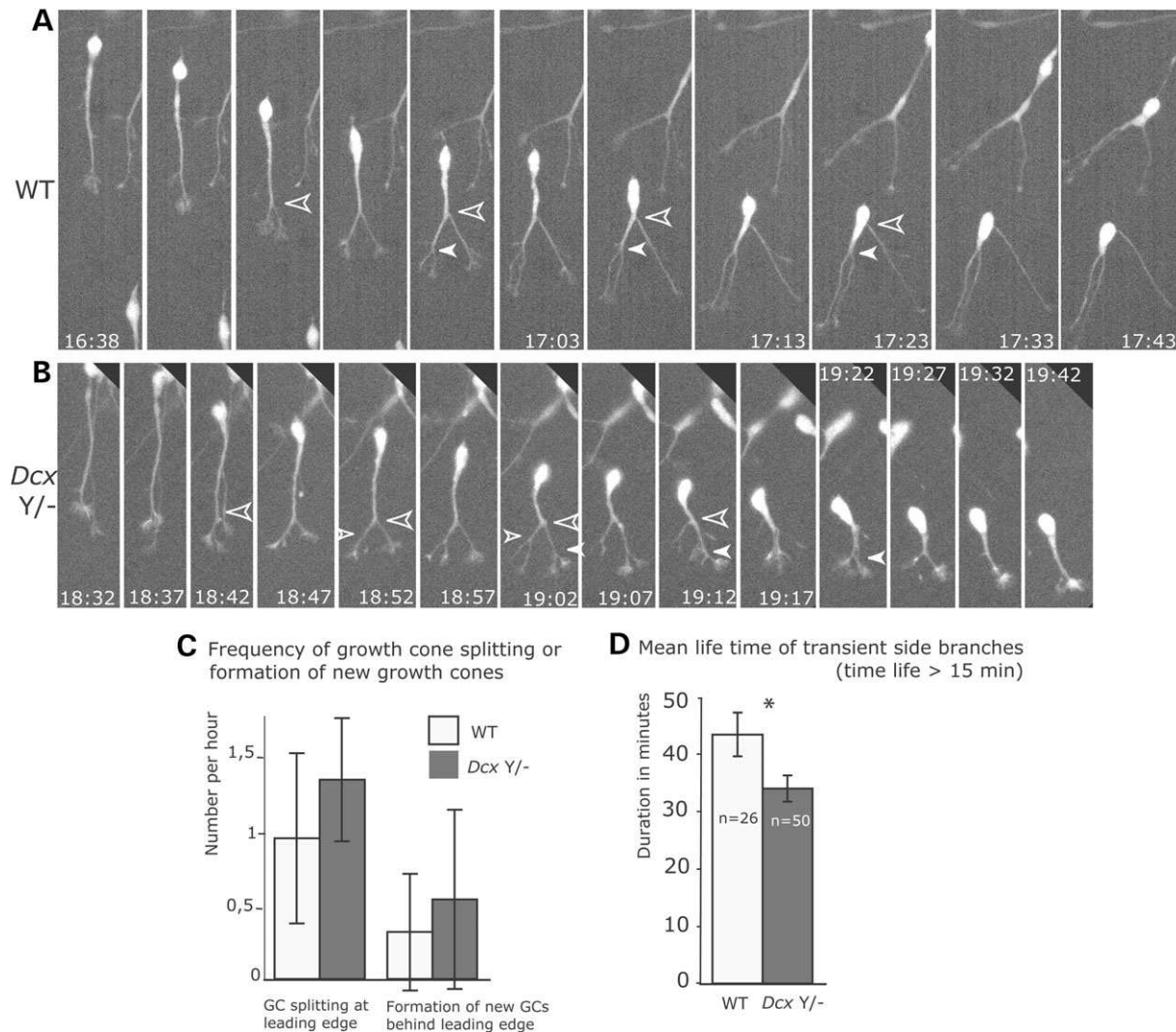
major characteristic features of MGE cell migration do not differ in such a model compared with their migration in slice cultures (30). In the co-culture system, green fluorescent protein (GFP)-expressing KO and WT MGE explants were deposited onto monolayers of GFP-negative dissociated cortical cells derived from WT mice. No differences were observed between *Dcx*<sup>-/-</sup> female homozygote mutant neurons and those derived from *DcxY*<sup>-/-</sup> males in these experiments, although male hemizygote explants were generally used. Cultures were incubated 12–24 h prior to video microscopy, generating films of migrating MGE cells for analysis. Cultures were then also fixed and stained with anti-GFP, in order to amplify the fluorescent signal and to analyse in detail the

complexity of the neuritic arbours of a larger number of fixed, migrating MGE cells.

Video microscopic analyses of the co-cultures also revealed branching abnormalities in KO MGE cells (Fig. 4A and B, Supplementary Material, Movies S1 and S2, WT and KO, respectively). Four independent video microscopy experiments, involving in total four WT and eight KO embryos, were performed giving reproducible results. Compared with WT cells, which develop a long branched leading process, KO cells were observed to extend shorter branches and to produce new branches at a higher frequency. As branching is dependent on the division or formation of a growth cone, we first analysed growth cone dynamics from the video films. Both growth cone splitting at the leading edge and the formation of new growth cones at other positions along the length of the neuritic processes appeared more frequent in KO cells (Fig. 4C, WT, mean of 1 leading growth cone split per hour, versus KO mean of 1.3 splits per hour; and WT mean of 0.3 versus KO mean of 0.6 new growth cones per hour at other positions). In total, five WT cells were recorded for  $299 \pm 122$  min; versus eight mutant MGE cells, recorded for  $247 \pm 124$  min for this analysis. Thus, the increased branching observed is reflected in the increased formation of new leading edge and side growth cones. Newly formed branches even in WT cells are known to be dynamic, first elongating, then either becoming the new leading process, or retracting and disappearing. Observations of the newly formed branches from the video films showed that growth cones of KO and WT cells apparently exhibit the same migration speed and new branches appear to grow at the same rate in both cases. However, an analysis of the lifetime of new branches, prior to growth cone collapse and retraction, showed that in general they exist for a shorter time in KO than in WT cells (Fig. 4D, WT mean lifetime of 43 min,  $n = 26$  branches analysed; KO mean lifetime of 34 min,  $n = 50$  branches analysed). The overall result is an apparently increased number of KO MGE cells with numerous short and unstable branches compared with WT, which give rise therefore to a more complex neuritic arbour.

The video microscopy observations were confirmed by quantifying MGE cell complexity in fixed and immunostained KO and WT co-cultures. Cells (WT,  $n = 104$ ; *Dcx* KO,  $n = 109$ ) were thus classed and counted according to whether they exhibited primary, secondary, tertiary, quaternary or quinary terminal processes (Fig. 5A). There were less KO cells with only primary and secondary terminal processes compared with WT (Fig. 5B, WT, 17.3% have primary and 47.1% secondary terminal processes; versus KO, 11.9% have primary and 19.3% secondary terminal processes) but more KO cells had tertiary, quaternary and quinary terminal processes (Fig. 5B, WT, 27.9% with tertiary, 6.7% with quaternary and 1% with quinary terminal processes; versus KO, 41.3% with tertiary, 18.3% quaternary and 8.3% with quinary terminal processes). Nevertheless, comparing WT and KO cells with a particular complexity showed no differences in the actual number of terminal processes, e.g. individual WT and KO cells with terminal tertiary processes were generally asymmetrically branched as shown in Fig. 5A, with only two terminal tertiary processes (data not shown). Thus, it is the number of highly branched cells that differs





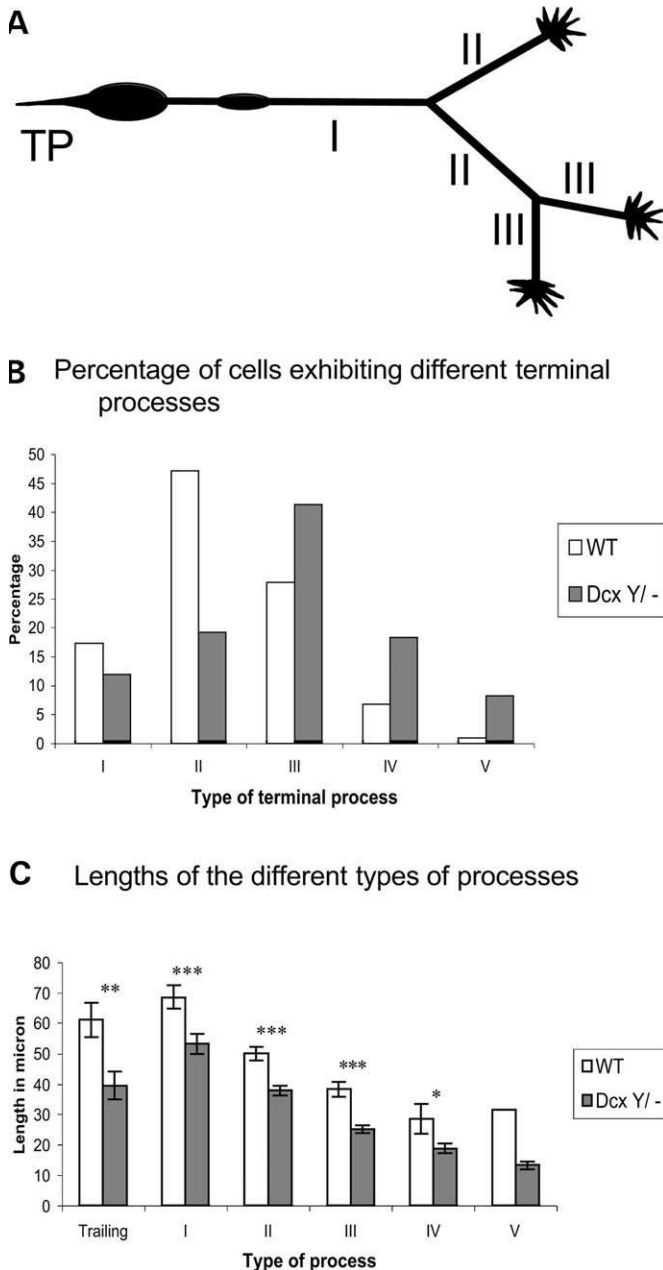
**Figure 4.** *Dcx* KO MGE cells produce more branches with shorter lifetimes than WT MGE cells. Time-lapse sequences of WT (A) and *Dcx* KO (B) E13.5 GFP-expressing MGE cells cultured on WT-dissociated cortical cells. Representative videos are also provided in the Supplementary Material. The time at which the video was performed is indicated in hours:minutes. The time between each frame is 5 min, or 10 min towards the end of each sequence. The largest compartment (the soma) at the rear of the cell contains the nucleus. Bifurcations of the leading neurite result from successive splittings (white and unfilled arrow heads) of the leading growth cone. Growth cones occasionally appear behind the leading edge along the length of the neurites, and form short side branches. The frequency of growth cone bifurcations is higher in a *Dcx*Y<sup>-/-</sup> cell (B) than in a WT cell (A). (C) Histograms compare in WT MGE cells (white bars, five cells recorded 299 ± 122 min in mean) and mutant MGE cells (grey bars, eight cells recorded 247 ± 124 min in mean) the number of leading growth cone splits per hour and the formation of new growth cones behind the leading edge that produce side branches observed for 15 min or more. (D) The histogram compares the mean lifetime of transient side branches observed for longer than 15 min and eliminated thereafter. *Dcx* KO side branches have a significantly shorter lifetime (\* differs from control at  $P < 0.025$ ).

in the KO and not the branching complexity of an individual cell *per se*. In agreement with observations of the video films, the average length of a particular type of process (primary, secondary, tertiary, etc.) in the fixed cultures was as much as 20% less in KO cells compared with WT cells (Fig. 5C; for WT cells: trailing process, 61.3 ± 5.7 μm,  $n = 81$ ; primary, 68.6 ± 3.9 μm,  $n = 122$ ; secondary, 50.1 ± 2.3 μm,  $n = 174$ ; tertiary, 38.4 ± 2.4 μm,  $n = 83$ ; quaternary, 28.7 ± 4.9 μm,  $n = 16$ ; quinary, 31.5 ± 22.2 μm,  $n = 2$ ; for KO cells: trailing process, 39.5 ± 4.6 μm,  $n = 64$ ; primary, 53.3 ± 3.3 μm,  $n = 128$ ; secondary 38.0 ± 1.6 μm,  $n = 204$ ; tertiary, 25.3 ± 1.2 μm,  $n = 181$ ; quaternary, 18.9 ± 1.6 μm,  $n = 79$ ; quinary; 13.4 ± 1.3 μm,  $n = 23$ ).

Thus our dynamic and static analyses reveal that KO MGE cells exhibit increased growth cone splitting and formation, leading to a higher frequency of new leading edge and side branches, which have however a shorter lifetime and a shorter length than WT MGE cell branches. These results thus strongly support a role for *Dcx*, a microtubule-associated protein, in growth cone dynamics and neurite stability in migrating MGE cells.

#### KO MGE cells also have swelling and nucleokinesis abnormalities

In interneuron precursors, the movement of the nucleus and branch production are tightly coupled (30). Thus, the saltatory



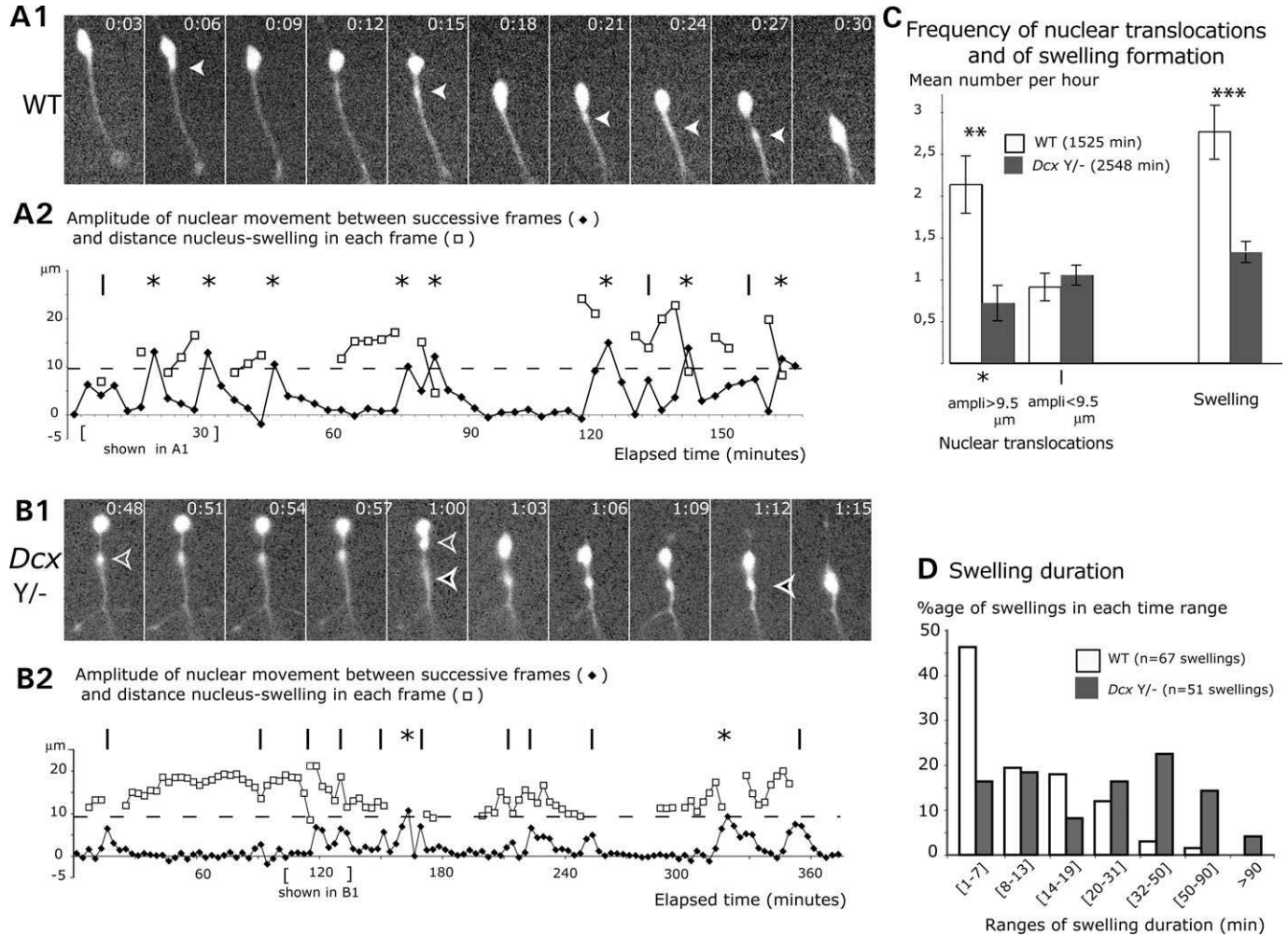
**Figure 5.** Quantification of MGE cells of different complexities in fixed and anti-GFP-immunostained KO and WT explant cultures. (A) Schema illustrating a branched migrating MGE cell and the nomenclature used to classify the different classes of processes. The cell depicted has one primary process (I), two secondary processes (II) and two tertiary terminal processes (III). TP, trailing process. (B) Histogram showing the percentages of the different classes of WT (white bars) and *DcxY*<sup>-/-</sup> cells (grey bars) with different terminal processes (WT, *n* = 104; *DcxY*<sup>-/-</sup>, *n* = 109). Higher percentages of WT cells exhibited only primary or secondary terminal processes, whereas more *DcxY*<sup>-/-</sup> cells showed tertiary, quaternary and quinary terminal processes. (C) Histogram showing the lengths of the different types of process in the same WT and KO cells. For WT cells: TP,  $61.3 \pm 5.7 \mu\text{m}$ , *n* = 81; I,  $68.6 \pm 3.9 \mu\text{m}$ , *n* = 122; II,  $50.1 \pm 2.3 \mu\text{m}$ , *n* = 174; III,  $38.4 \pm 2.4 \mu\text{m}$ , *n* = 83; IV,  $28.7 \pm 4.9 \mu\text{m}$ , *n* = 16; V,  $31.5 \pm 22.2 \mu\text{m}$ , *n* = 2. For KO cells: TP,  $39.5 \pm 4.6 \mu\text{m}$ , *n* = 64; I,  $53.3 \pm 3.3 \mu\text{m}$ , *n* = 128; II,  $38.0 \pm 1.6 \mu\text{m}$ , *n* = 204; III,  $25.3 \pm 1.2 \mu\text{m}$ , *n* = 181; IV,  $18.9 \pm 1.6 \mu\text{m}$ , *n* = 79; V,  $13.4 \pm 1.3 \mu\text{m}$ , *n* = 23. The average length of each type of process is significantly shorter in KO compared with WT cells (\* differs from control at  $P \leq 0.05$ , \*\* at  $P \leq 0.01$  and \*\*\* at  $P \leq 0.001$ ).

movement of the nucleus is coupled with growth and branching of the leading process, and nuclear jumps occur into a swelling, newly formed within the leading process, after branching has occurred. Correspondingly, analysis of video microscopy films of *Dcx* KO MGE cells showed that, in addition to abnormal branching, nuclear movement is also affected (Fig. 6, Supplementary Material, Movies S3 and S4, WT and KO, respectively). During migration of WT neurons, a distinct and round swelling that contains the microtubule-organizing centre (MTOC) and Golgi apparatus periodically forms and migrates towards the leading edge at some distance away from the cell soma, and then receives the translocating nucleus and becomes itself the new soma. This has been shown not only for MGE-derived cells but also for SVZ interneuron precursors migrating to the olfactory bulb (36). In KO neurons, a variety of swelling types were observed even in the same cell, ranging from an apparently normally functioning swelling, to a less distinct swelling that does not completely separate from the cell soma, or to a swelling observed at an appreciable distance from the nucleus for abnormally long periods of time (up to 2 h, compare A1 and A2 with B1 and B2 of Fig. 6). Additionally, the size of the swelling was often larger in *Dcx* KO than in WT cells (Fig. 6A1 and B1). As a consequence of these changes, the frequency of swelling formation is significantly decreased in KO cells (Fig. 6C, right histogram, WT, mean of 2.7 swellings per hour versus KO, mean of 1.3 swellings per hour), whereas the lifetime of swellings is strongly increased (Fig. 6D, e.g. 46% of WT swellings existed between 1–7 min, compared with 16% of KO swellings, whereas 3% of WT swellings existed between 32–50 min compared with 23% of KO swellings, WT, *n* = 67 analysed; KO, *n* = 51 analysed).

Unlike WT cells in which the swelling gradually moves towards the leading edge away from the nucleus, in KO cells it can move both forward and backward in the leading neurite (Fig. 6B1, frames 1:00 and 1:12). Such oscillations of the MTOC-containing swelling thus suggest that KO cells are less polarized. Indeed, observations of the video films also showed more KO cells performing complete polarity reversals, and such changes in direction, by selection of the trailing process as the new leading process, are rare in WT cells.

Surprisingly, the changes observed in swelling dynamics do not affect the nuclear migration speed, which is similar in both WT and KO cells (WT,  $100.93 \pm 4.7 \mu\text{m/h}$ , *n* = 18; KO,  $100.92 \pm 4.8 \mu\text{m/h}$ , *n* = 18). In contrast, the dynamics of nuclear movement often differ between KO and WT cells. For example, as shown for the cells in Fig. 6A and B, long nuclear displacements (jumps superior to  $9.5 \mu\text{m}$ , shown by an asterisk in the upper parts of graphs in Fig. 6A2 and B2) were three times less frequent in the KO cell studied, whereas shorter nuclear displacements (jumps inferior to  $9.5 \mu\text{m}$ , shown by a bar in the upper parts of graphs in Fig. 6A2 and B2) were as frequent in KO as in WT (Fig. 6C). For WT, five cells were analysed for  $305 \pm 50$  min each, and thus 1525 min in total. For *Dcx* KO, eight cells were analysed for  $318 \pm 70$  min each, and thus 2548 min in total. Observations of the video films also showed that nuclei of KO cells more often advance by short gliding





**Figure 6.** *Dcx* KO MGE cells exhibit disorganized nucleokinesis (but no changes in nuclear speed). Time-lapse sequences illustrate nuclear and MTOC-containing swelling movements in the perinuclear region of WT (**A1**) and *Dcx* KO (**B1**) GFP-expressing MGE cells migrating on dissociated cortical cells. Elapsed times are indicated in hours:minutes at the right top corner of each frame. The time between two successive frames is 3 min. In the WT cell (**A**), the nucleus translocates rostrally towards a transient swelling that contains the MTOC [white arrow head (30)]. In the KO MGE cell (**B**), the swelling (unfilled arrowhead) is larger and present for a longer duration. The swelling can also frequently move back towards the nucleus (frames 1:00 and 1:12), which is a rare event in WT cells. Under each time-lapse sequence, graphs show successive distances moved by the nucleus (black lozenges) and distances from the nucleus to the swelling (white squares), when a swelling is present. The WT MGE cell exhibits larger amplitudes of nuclear translocation (indicated by asterisks in graphs **A2** and **B2**) than the *Dcx* KO MGE cell, although short nuclear jumps (indicated by bars in graphs **A2** and **B2**) seem more frequent in *Dcx* KO cells. Swellings are also observed for much longer durations in *Dcx* KO cells. (**C**, **D**) Quantifications performed in these same cells show that long-distance nuclear translocations (shown by an asterisk) are three times more frequent (histogram **C**, left side) in WT than in *Dcx* KO MGE cells and that swellings form twice more frequently in WT than in *Dcx* KO MGE cells (histogram **C**, right side). The frequency of nuclear translocations >9.5 μm is statistically significant (\*\* differs from control at  $P < 0.01$ ). For WT, five cells were analysed for  $305 \pm 50$  min each (1525 min in total). For *Dcx* KO, eight cells were analysed for  $318 \pm 70$  min each (2548 min in total). In addition, short-duration swellings (histogram **C**, right side) are much more frequent in WT MGE cells (white bars), whereas swellings observed for more than 30 min are much more frequent in *Dcx* KO MGE cells (grey bars, \*\*\* differs from control at  $P < 0.001$ ). The lifetime of swellings is strongly increased (**D**), e.g. 46% of WT swellings existed between 1–7 min, compared with 16% of KO swellings, whereas 3% of WT swellings existed between 32–50 min compared with 23% of KO swellings (WT,  $n = 67$  analysed; KO,  $n = 51$  analysed).

movements than WT cells, instead of using more distinct jumps. Gliding nuclei were observed to move short distances within an oval-shaped soma, not forming an independent swelling. Thus, branching defects in KO MGE cells are coupled with nucleokinesis defects, the latter being characterized by shorter-distance nuclear displacements and abnormal swelling dynamics. This disrupted movement of organelles in KO MGE cells nevertheless does not change overall nuclear migration speed, and as shown in slice cultures, KO

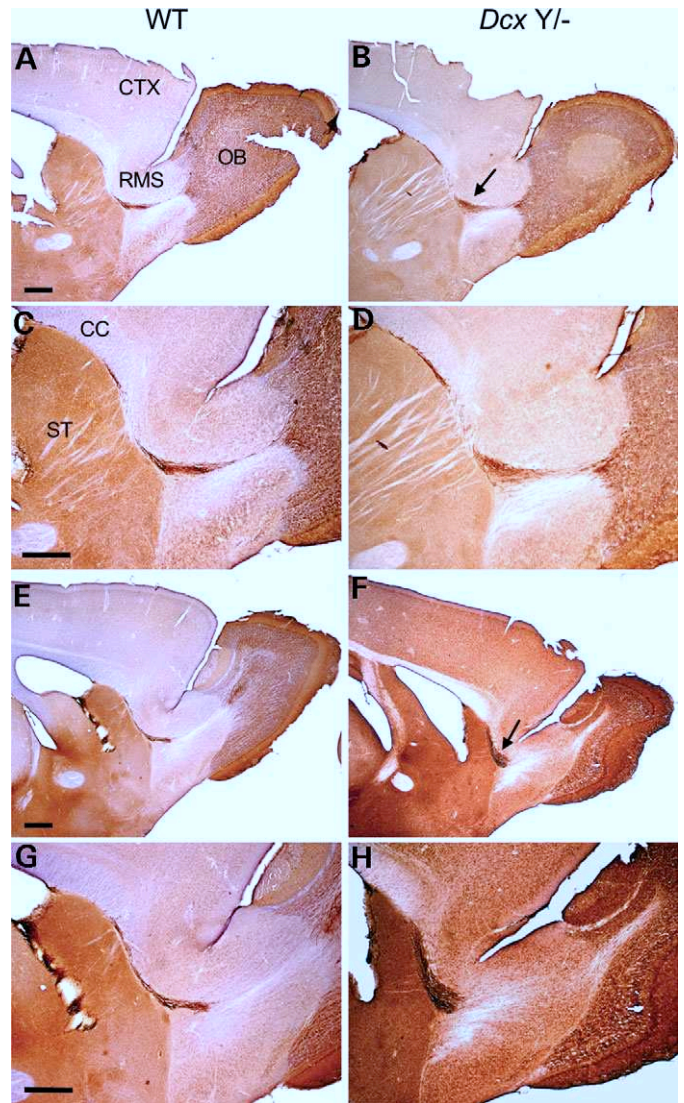
cells are able to reach the cortex despite the migration abnormalities.

**Dcx KO mice show no major differences in MGE-derived interneuron distribution *in vivo*, but have an abnormal RMS**

Such tangential migration abnormalities detected *in vitro* might be expected to have consequences on the distribution

of MGE-derived interneurons *in vivo*. In order to look for such interneuron abnormalities in *Dcx* KO mice, we performed immunohistochemistry experiments testing interneuron markers. Using anti- $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), anti-parvalbumin, anti-calretinin and anti-ARX antibodies, we were unable to detect major abnormalities in the distribution or number of these interneuron populations. Specifically, analyses of the distribution of GABA-positive cells in brain sections at E12.5, E13.5, E14.5 (Supplementary Material, Fig. S1), PN1 and in the adult showed no major differences between KO and WT. Also the distribution of ARX at E13.5, E16.5 and PN1 did not differ (data not shown). On the other hand, quantitative analyses of the calretinin subpopulation of interneurons in adult brain sections showed subtle differences between a KO and WT animal both in the cortex and in the hippocampus (KO sections had on average 88 and 79% the number of cells in WT sections, respectively; Supplementary Material, Figs S2 and S3 and Tables S1 and S2). This result is interesting because it might suggest slowed or aberrant migration of calretinin-positive cells from the ganglionic eminences. Further studies in the future are, however, required to test this interneuron subpopulation in a larger number of KO animals, in order to support this result and to rule out inter-animal variability.

In addition, we analysed polysialic acid–neural cell adhesion molecule (PSA–NCAM)-positive interneuron precursors, which migrate in the RMS towards the olfactory bulb in the adult (37) and have been shown to strongly express *Dcx* (21,22 and our unpublished results). Such cells show similar migratory dynamics to MGE cells, in the respect that they have a long leading process and that swellings form distal to the nucleus, prior to nuclear displacement (36). Nevertheless, migratory mechanisms and substrates are still likely to be different from MGE cells, as RMS cells form homotypic interactions and migrate in chains, in close proximity to glial cell tunnels (38). Our analyses suggest that *Dcx* KO mice have subtle RMS abnormalities (Fig. 7). Sagittal sections from two KO animals were analysed in comparison with one WT animal. PSA–NCAM immunohistochemistry was performed using immunoperoxidase detection. PSA–NCAM-positive interneuronal precursors were observed in the RMS, stemming from the anterior horn of the lateral ventricle to the olfactory bulb in both the WT and KO animals. However, in the two KO animals, the RMS appeared thicker than that in WT. Indeed, the WT RMS appears as a thin compact channel, whereas the KO RMS appears more diffuse, covering a larger area. KO cells nevertheless still seem to be organized in chains, as in WT. Interestingly, examination of the olfactory bulb in *Dcx* KO animals shows no obvious macroscopic or microscopic abnormalities (Supplementary Material, Fig. S4). Thus, it appears that a slightly disorganized migratory stream in the adult is nevertheless compatible with the correct insertion of new cells in the olfactory bulb during adult life. It will now be interesting to confirm this result in a larger number of animals and to analyse the RMS at early postnatal stages in order to assess whether a similar disorganization occurs, or to see if this is restricted to the adult. In summary, subtle migration abnormalities identified in a second type of interneuron precursor in *Dcx* KO mice strongly support our *in vitro* findings of aberrant MGE cell migration.



**Figure 7.** *Dcx* KO mice show RMS differences. A sagittal section from a WT animal (A, C) is compared with a similar section from a KO animal (B, D). The RMS, which in normal animals shows a strong expression of *Dcx*, seems broader in the KO section (arrow, B). Different sections are compared at another lateral–medial level. At this level, the RMS is only partially observed. Once again, the KO RMS (F, H) appears broader than the WT RMS (E, G). A second KO animal was also analysed showing similar results. CTX, cortex; OB, olfactory bulb; ST, striatum; CC, corpus callosum. The scale bars for all images represent 500  $\mu$ m.

## DISCUSSION

Human lissencephaly is associated with a severe disorganization of the cortex involving an abnormal positioning of both pyramidal neurons and interneurons. Previous rodent models targeting the *Dcx* gene have indicated either an absence of neocortical abnormalities in a mouse KO model (15), or, unexpectedly, abnormalities affecting radially migrating neocortical neurons in an RNAi model (18,19). The mice we describe here more closely resemble the previously reported KO model than the RNAi model, as radial migration of pyramidal cell precursors in our KO mice



appears largely normal. A possible explanation for the difference in phenotype between *Dcx* KO models and RNAi-injected mice could be the temporally discrete disruption, or partial inhibition of *Dcx* in the RNAi model. Thus *Dcx*'s function may not be compensated by other proteins, as may occur in the *Dcx* KO. Analysis, however, of MGE cells in slice and explant cultures in our KO model reveal subtle abnormalities in the migration dynamics of future interneurons. In particular, migrating KO MGE cells show both increased branching as well as nucleokinesis defects. Our data also show potential migration abnormalities in PSA-NCAM-positive interneuron precursors migrating in the RMS in *Dcx* KO mice. These combined data support a role for *Dcx* in tangential migration dynamics. It is possible that similar or more severe abnormalities also exist in human fetal interneuron precursors in type I lissencephaly, with perhaps also more widespread consequences in primate than in rodent brain, but this is difficult to test directly. In mouse, the subtle abnormalities identified provide a further clue to the function of *Dcx* during tangential migration.

We investigated the behaviour of interneuron precursors migrating from MGE explants onto a monolayer of dissociated WT cortical cells. The complete morphology of individual GFP-positive cells is easily discernible using this co-culture system (30). In live co-cultures, we observed that KO cells more frequently formed and retracted both leading edge and side branches. Specifically, the absence of *Dcx* leads to a higher frequency of growth cone formation and a decrease in branch stability. As a result, the large majority of KO cells showed a more complex neuritic arbour than WT cells and quantifications in fixed co-cultures showed that KO cells had significantly shorter processes. These results are thus coherent with our initial observations of increased branching in KO slice cultures. *Dcx* has been shown to be enriched at the extremities of neurites proximal to the growth cone in dissociated cortical neurons (20,39). A similar localization has been shown for *Dcx* at the extremities of leading processes in migrating interneuron precursors destined for the olfactory bulb (22). In particular, the latter study showed that *Dcx* was present in nascent secondary processes in these cells when they exist. These combined data suggest a major function for *Dcx* in growing processes. Interestingly, *Dcx*-RNAi experiments in radially migrating neurons showed that *Dcx*-inhibited cells took on a multipolar phenotype (18), with multiple fine processes stemming from the cell soma (40). However, KO MGE cells observed here did not resemble multipolar cells. Instead, they generally exhibited only two principal processes (leading and trailing) stemming from the cell soma and were observed to frequently change direction, even to the extent of selecting the process on the opposing side of the nucleus. One interpretation of these data is that *Dcx* plays a role in maintaining and stabilizing leading process identity.

Indeed, *Dcx*'s function as a microtubule-associated protein (MAP) (20,21,24), polymerizing and stabilizing microtubules, is quite consistent with a role in process formation and maintenance (41). Thus it is possible, in the absence of *Dcx*, that microtubules are less stable, with new growth cones more easily formed at ectopic localizations along the neurite shaft. Indeed, local application of nocodazole, a

microtubule-depolymerizing agent, has been shown to encourage membrane addition at ectopic sites in differentiating neurons (42). Thus, side branches could perhaps form more easily in the absence of *Dcx*. We can also imagine that processes with less stabilized microtubules have a transient nature and retract more frequently in these cells. Thus, our data showing a higher frequency of newly formed growth cones, leading to the generation of more numerous, but less stable branches, is in fitting with the loss of an MAP, normally enriched in growing processes. Further support for the importance of microtubule dynamics in controlling the branching of neurites has also been provided by an analysis of dorsal root ganglia (DRG) neurons derived from *map1b* mouse mutants (43). Cultures of mutant adult DRG neurons showed significantly higher terminal and side branching and these defects were correlated with reduced amounts of acetylated tubulin, known normally to be associated with highly stable microtubule populations. Aside from its microtubule-related functions, *Dcx* is also potentially involved in vesicle trafficking (39), regulation of cell adhesion and protein stability (44,45), and microtubule-actin crosstalk (46,47). Disruption of each of these processes could also potentially influence leading edge and branching dynamics (41). Thus, further studies are required to investigate each of these mechanisms in *Dcx* KO cells, in order to fully explain the branching phenotype.

In WT co-cultures, polarity reversal, a rare event involving the change in position of the MTOC and the establishment of a leading process at the rear of the cell, is observed before an MGE cell reverses its direction of migration. As discussed here, *Dcx* KO cells reverse their polarity more frequently than WT cells. It is possible that this is a consequence of the perturbed nuclear movements and abnormal dynamics of the MTOC-containing swelling, where swelling movements are not so tightly correlated with nuclear movements. KO swellings thus often showed retrograde movements towards the nucleus, rarely observed in WT MGE cells. KO nuclei also perform shorter amplitude jumps than WT cells and complement these with less distinct gliding movements. Interestingly, an involvement of *Dcx*, together with *Lis1*, in nuclear-centrosome coupling has previously been suggested, by *Dcx* overexpression in radially migrating cerebellar *Lis1*<sup>+/-</sup> granule neurons (26). Process growth and branching, normally tightly coupled to nucleokinesis in MGE cells, were not however assessed in this study, making it difficult to completely correlate these results with our study. *Dcx* could thus have a direct role in nuclear-centrosomal mechanisms in MGE cells or alternatively, the nucleokinesis defects could be secondary to leading edge abnormalities. Such defects could also be present in tangentially migrating PSA-NCAM-positive interneuron precursors, although this remains to be thoroughly investigated.

Surprisingly, changes in nucleokinesis dynamics in MGE cells did not affect the mean nuclear speed of migration. Indeed, it has recently been shown that the mechanism of nucleokinesis is heavily dependent upon myosin II function at the rear of the cell (30,36). Thus, inactivation of *Dcx*, a microtubule-associated protein, most probably has little effect on the major acto-myosin forces required to move the nucleus. Coherent with a normal nuclear speed in co-cultures, we observed that MGE-derived KO cells in slice cultures

appeared to migrate equivalent distances to WT cells and GABA-labelling of embryonic brain sections showed similar results between KO and WT. Thus, a large proportion of KO MGE cells are apparently still able to migrate relatively efficiently *in vivo*. In fitting with these data, we were unable to detect major abnormalities in the distribution or number of several different populations of cortical interneurons detected immunohistochemically in adult KO brain sections. Subtle differences in the number of calretinin-positive cells in the cortex and hippocampus, however, warrant further investigation of this subpopulation. It also remains possible that other subpopulations, not yet examined, will be affected, or that some subpopulations will show differences in distribution at specific times during their development (48). Other interneuron markers such as calbindin, neuropeptide Y, somatostatin and glutamate decarboxylase 67 and 65 should also therefore be tested to complete this analysis. It will also be important to examine the final morphology of each of the different interneuron subtypes, e.g. by Golgi stainings, in order to search for potential differences.

PSA-NCAM-positive interneuron precursors are derived from the anterior SVZ and continue to be produced and migrate during adulthood (37). Cell morphology during migration is similar to MGE cells (36) and these cells have previously been shown to express *Dcx* at the extremities of their leading processes (22). The abnormalities we identified in *Dcx* KO animals are similar to those observed in *neural cell adhesion (NCAM)* KO mice (49). However, these *NCAM* KO mice also show a severe reduction in the size of their olfactory bulbs, which is not observed in *Dcx* KO mice. It is likely, therefore, that closer examination of the RMS will reveal differences between these KO models. Interestingly, *Dcx* has also been suggested to play a role in adhesion (44,45) and therefore perturbed interactions between neurons and their substrates during migration may explain this phenotype. Such abnormalities may thus also fall into the category of subtle tangential migration abnormalities, which have no major lasting effect on the target structure. It will, however, be interesting in the future to test *Dcx* KO mice for olfactory deficits and to visualize the migratory dynamics of *Dcx* KO SVZ-derived cells *in vitro*.

The existence of only subtle interneuron abnormalities in mouse brain *in vivo* might in fact be expected, when more globally comparing mouse *Dcx* KO and human type I lissencephaly phenotypes. Indeed, for radially migrating pyramidal cell precursors, there is an enormous difference between the severe disorganization observed in type I lissencephaly compared with the lack of major abnormalities in the radial organization of the mouse KO cortex. Comparing then interneuron abnormalities in cases of Miller Dieker syndrome, which result from reduced amounts of LIS1, calretinin-positive interneurons in the fetal neocortex showed a 10-fold reduction compared with controls (11). Similarly, in cases of *DCX*-mutated lissencephaly, clusters of calretinin-positive cells have been detected ectopically underneath the white matter, with a corresponding deficit of interneurons observed in the disorganized cortical plate (Gundela Meyer, personal communication). Thus, like radial migration abnormalities, severe interneuron abnormalities in human are also not identically replicated in the mouse KO. It is clear then that the

*in vitro* models we have used, combined with video microscopy, have been extremely useful in helping us identify subtle abnormalities in *Dcx* KO interneuron precursors and have provided further insight into the function of *Dcx* in migrating cells. Importantly, these data provide us with hints towards understanding the potential pathophysiological mechanisms involved in type I lissencephaly and further emphasize that perturbations of the interneuron network are very likely to directly contribute to the epilepsy observed in these cases.

## MATERIALS AND METHODS

### Mice

Homozygote, hemizygote and heterozygote *Dcx* mutant mice were maintained on C57BL/6 and Sv129*Pas* backgrounds. Mice were genotyped at postnatal day 10 (P10) or at embryonic stages by either Southern blotting or polymerase chain reaction (PCR) following standard methods (50). The KO mice studied here were generally *DcxY*<sup>-</sup> males on a defined background, generated in most cases with WT littermate controls by crossing heterozygote females with pure C57BL/6 or Sv129*Pas* males (Charles River, France). Such crosses were preferred because of the ease of generating WT littermate controls (50% of the litter), with heterozygotes (25%) and KO animals (25%) in the same litter.

For video microscopy experiments *Dcx* KO mice were crossed with ubiquitously GFP-expressing mice (51), on the C57BL/6 background. WT and *Dcx* KO GFP-expressing embryos resulted from crosses between *Dcx*<sup>+/-</sup> heterozygous females and GFP-expressing WT or *DcxY*<sup>-</sup> males or GFP-expressing *Dcx*<sup>+/-</sup> females and WT or *DcxY*<sup>-</sup> males. Pregnant females were killed by cervical dislocation and the embryos dissected in cold Leibovitz medium (L15, Invitrogen, France). No differences were observed between *Dcx*<sup>-/-</sup> female homozygote mutant neurons and those derived from *DcxY*<sup>-</sup> males. Experiments involving mice were performed by authorized investigators adhering to French and European guidelines (approved by the French Ministry of Agriculture and Fisheries and following the European Community Council Directive for the care and use of laboratory animals), and experiments and animal care were followed by regional veterinary offices (Directions des Services Vétérinaires Départementaux).

### Inactivation of *Dcx* by homologous recombination

A conditional construct was generated involving the Cre-loxP site-specific recombination system. An 11 kb *XbaI*-*ScaI* fragment containing *Dcx* exon 3 was cloned in pBR322 *EcoRI*-*EcoRV*. The *EcoRV* site in the vector was modified by the addition of an *SpeI* linker and this site was later ligated to an *XbaI* site, thus destroying both sites. The *ScaI* site in the *Dcx* locus was modified to include *EcoRI* and *HindIII* sites to allow the cloning at the other extremity. A loxP site containing a *BamHI* restriction site was inserted in the *BsaI* site upstream of exon 3. A floxed PGK-*neo* selection gene was inserted into the *XbaI* site downstream of this exon. This construction was cut with *HindIII* to release the vector and the linearized insert was electroporated in embryonic stem (ES) cells

(origin *Sv129Pas*) following standard methods. ES cell clones were tested by Southern blotting using external 5' and 3' probes as indicated in Fig. 1. Mice carrying a floxed *Dcx* allele (with lox P sites flanking exon 3) in addition to a floxed selection gene were crossed with Cre transgenic mice expressing the Cre enzyme early in development [Meu-Cre-40, corresponding to mosaic early embryonic ubiquitous (Meu) Cre mice, line 40 in 31]. This cross-generated KO mice (having deleted *Dcx* exon 3 and the selection gene) and mice deleted for the selection gene but still carrying the floxed exon 3, which would allow a later invalidation of *Dcx* in a spatially and temporally controlled manner.

### Western blots and immunodetections

To confirm the deletion of exon 3 and the absence of *Dcx* protein in homozygote and hemizygote mutant mice, protein extracts were prepared from E14.5 embryos (where E0.5 is the day of detection of the vaginal plug), and analysed by sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting following standard procedures (50). Antibodies directed against *Dcx* [Nterm (20), 1:5000, C18, Santa Cruz, CA, USA, 1:500] and  $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA, 1:10000) were used for immunodetection.

### BrdU labellings and immunohistochemistry

Neuronal progenitor cells of embryos at different stages of development were labelled *in vivo* by intraperitoneal injections of timed-pregnant females with BrdU (Sigma-Aldrich, 150  $\mu$ g/g body weight). Females were sacrificed and embryos recovered at different times after injection ranging from 30 min to several days. Alternatively, newborn mice were sacrificed and the brains recovered for analysis. Brains were either frozen directly in isopentane or first fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA) and cryoprotected in 10% (w/v) sucrose in phosphate buffer (pH 7.4) prior to freezing. Ten micrometres serial sections were obtained using a Leica CM3050S cryostat. Immunodetections were performed with anti-BrdU antibody (BD Biosciences Pharmingen, CA, USA, 1:25) using an ARK Peroxidase kit (DAKO, CA, USA) and sections were counter-coloured using Hemalun Mayer (Merck, Germany) followed by ammonium acetate (10 mM) treatment. For experiments involving adult animals, these were perfused with 4% PFA or 4% PFA and 2% glutaraldehyde, followed by cryoprotection in 30% sucrose of the brain. Cryostat sections or freezing microtome sections (40  $\mu$ m, Leitz 1703 Kryomat) were also immunostained for the following cortical markers using immunofluorescence or immunoperoxidase detection: anti-Reelin G10 (1:50, kindly provided by A. Goffinet, University of Louvain Medical School, Brussels, Belgium) (52); anti-PSA-NCAM (1:500, mouse, kindly provided by P. Durbec, IBDM, Marseilles, France), anti-calretinin (1:10000, rabbit, Swant Laboratories, Switzerland), anti-parvalbumin (1:10000, rabbit, Swant Laboratories, Switzerland), anti-CSPG, clone CS-56 (1:50, Sigma-Aldrich); anti-ARX (1:1000) (53); anti- $\beta$  III tubulin (1:500, mouse, BabCo, Richmond, CA, USA); anti-nestin, clone Rat-401 (BD Biosciences Pharmingen, 1:40); and

anti-MAP2 (1:300, mouse, Sigma-Aldrich). Freezing microtome sections were mounted on gelatinized slides. For fluorescently labelled sections, nuclei were stained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich) present in the mounting solution (Mowiol, Calbiochem, La Jolla, CA, USA) at a concentration of 150  $\mu$ g/ml.

After 2 days *in vitro* or after the video microscopy, MGE cultures on cover-slips were similarly fixed in 4% (w/v) PFA/10% (w/v) sucrose in phosphate buffer (pH 7.4). After permeabilization, cultures were incubated overnight with primary anti-GFP (1/1000; Molecular Probes, Eugene, OR, USA and Roche Diagnostics, IN, USA). Labelled cultures were analysed using an epifluorescence microscope (DMRD, Leica, Germany) equipped with a Coolsnap camera (Photometrics, CA, USA) and analysed with Neuron J (NIH Image, MD, USA) software.

### Slice cultures, injection of fluorescent markers

Brain slices were prepared from E13.5 to E14.5 WT and KO C57Bl/6 and *Sv129Pas* mouse embryos. No differences were observed between the different backgrounds. Brains were dissected in cold Leibovitz L-15 medium (Invitrogen, France) supplemented with penicillin and streptomycin (PS, 50 UI, Invitrogen, France) and embedded in 3% (w/v) low melting point agarose (type VII, Sigma-Aldrich). Three hundred micrometres thick coronal sections corresponding to the anterior half of the cerebral hemispheres were cut with a tissue slicer (Campden Instruments Ltd, UK) and deposited on Millicell membranes (Biopore semi-permeable culture membranes, Millipore, France) in DMEM F-12 (Invitrogen, France), glucose 2.4 g/l, L-glutamine 100  $\mu$ M, 1 $\times$  N2 (Invitrogen, France), 1 $\times$  B27 (Invitrogen, France), 5% (v/v) fetal calf serum (Invitrogen, France), PS 50 UI (54). In order to label the population of migrating interneurons generated in the ventral telencephalon, fragments of bamboo (on average 500  $\mu$ m long, 200  $\mu$ m wide and less than 100  $\mu$ m thick) soaked in CMFDA (C-2925, Molecular Probes, 10 mM in dimethyl sulphoxide) were inserted in the MGE of each slice. Slices were then transferred to a humidified incubator at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> and cultured for 48 h prior to 4% PFA fixation. Fixed slices were analysed using an epifluorescence microscope (Leica) equipped with a Coolsnap camera (Photometrics) and a Leica TCS confocal microscope.

### Co-cultures of MGE cells on a carpet of cortical neurons

MGE explants from E12.5 or E13.5 WT and *Dcx* KO GFP-expressing embryos were deposited on WT-dissociated cortical cells. Dissociated cortical cells were prepared from E13.5 or E14.5 embryos and cultures were performed as described in Bellion *et al.* (30).

### Time-lapse video microscopy

MGE explants were cultured on a carpet of cortical neurons in Petri dishes equipped with glass cover-slips and the culture medium was replaced with HEPES (N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)) buffered minimal essential



media (MEM) which was phenol red free (Sigma-Aldrich), containing NaHCO<sub>3</sub> 4 mM, HEPES 20 mM, L-glutamine 2 mM, glucose 33 mM, pyruvate 1 mM, penicillin/streptomycin 10 UI/ml, supplemented with N2 and B27 (Invitrogen, France). Co-cultures were placed in a humidified and thermo-regulated chamber maintained at 37°C on a stage of an inverted epifluorescence microscope (Axiovert 200, Carl Zeiss, Germany), equipped with a monochromator light, a cooled CCD camera (ORCA, Hamamatsu Photonics, Japan), a motorized stage, a piezo z objective and Plan-apochromat 20x/0.75 NA and Plan-neofluar 40x/0.75 NA objectives (Carl Zeiss).

Images of living GFP-expressing migrating interneurons were acquired during 4–16 h at a frequency of one image each minute, each 3 min or each 5 min. Exposure time was 700 or 1000 ms. Precautions were taken to image WT and KO cultures which had been in culture for similar periods of time. Acquisition and illumination devices were driven by Metamorph software (Universal Imaging, West Chester, PA, USA). Sequences of 8- or 16-bit images were analysed using Metamorph, Image J and Neuron J (NIH Image) software.

For all experiments described here, *Dcx* KO tangentially migrating neurons were analysed on a carpet of WT cortical cells. It would also be possible to test *Dcx* KO tangentially migrating neurons on a carpet of *Dcx* KO cortical cells. With such experiments, it should thus be possible to dissect cell autonomous from non-cell autonomous mechanisms.

#### Analysis of migrating interneurons *in vitro*

The Metamorph tracking function was used to follow the movements of the nuclei, the MTOC-containing swellings and the growth cones in video films. The nuclear migration speed was measured in a certain time window during the imaging period, to avoid biases due to perturbation of the culture prior to the imaging period and deterioration of the cells towards the end of the imaging period.

Appropriate indices were developed to compare the morphology of migrating neurons from KO versus WT GFP-immunostained co-cultures using Neuron J (NIH Image). These analyses were as follows: (1) the number of cells of different complexities was divided by the total number of cells analysed to generate a percentage (Fig. 5B), (2) the length of process branches (defined as primary, secondary, tertiary, etc.) emerging from a given interneuron, whatever the complexity of the neuron, was traced and measured. Average lengths for each branch type were then calculated (Fig. 5C) and (3) in order to test for branching asymmetry, the numbers of each type of terminal branch were counted and divided by the number of analysed cells in each class. For statistical comparisons between WT and KO conditions, a Shapiro Wilk test was used to test all data for Gaussian distribution, a Student's *t*-test was thus used (bilateral,  $\alpha = 5\%$ ) for data following a normal distribution, presented in Figs 3B and 6C (right side of the graph) and for the nuclear migration speed data. For the data presented in Fig. 5C, initially a Kruskal–Wallis test was used on the pooled data, followed by individual Mann–Whitney tests for the different categories. This test was also used for the data presented in Figs 4D and 6C (left side of the graph).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at HMG Online.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by grants from INSERM, CNRS, the European Commission (No. QL3-CT-2000-00158), the French Ministère de la Recherche (ACI-1066G and fellowships to C.K. and J.-P.B.), the Fondation Jérôme Lejeune (to C.M.) and the Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (C.M. and F.F., 2004, 2005). The contribution of the Région Ile-de-France to the Institut Cochin animal care facility is also acknowledged. The authors are very grateful to Gundela Meyer for communicating unpublished data, to Masuru Okabe for providing the act-EGFP green mice, to Egbert Welker for helpful discussions, to André Goffinet for providing anti-reelin antibodies, to Pascale Durbec for providing anti-PSA NCAM antibodies, to Charles Hébert for aid with statistical analyses, to Evelyne Souil for help with immunohistochemistry experiments and to Emma Cheesman and Marie-Claude Vinet for technical assistance. We thank other members of J. Chelly's Laboratory for their contribution to this study.

*Conflict of Interest statement.* None declared.

## REFERENCES

1. Farrell, M.A., DeRosa, M.J., Curran, J.G., Secor, D.L., Cornford, M.E., Comair, Y.G., Peacock, W.J., Shields, W.D. and Vinters, H.V. (1992) Neuropathologic findings in cortical resections (including hemispherectomies) performed for the treatment of intractable childhood epilepsy. *Acta Neuropathol.*, **83**, 246–259.
2. Harding, B. (1996) Gray matter heterotopia. In Guerrini, R., Andermann, F., Canapicchi, R., Roger, J., Zifkin, B. and Pfanner, P., (eds) *Dysplasias of Cerebral Cortex and Epilepsy*, Lippincott-Raven, Philadelphia, USA, pp. 81–88.
3. Reiner, O., Carrozzo, R., Shen, Y., Wehnert, M., Faustinella, F., Dobyns, W.B., Caskey, C.T. and Ledbetter, D.H. (1993) Isolation of a Miller–Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature*, **364**, 717–721.
4. des Portes, V., Pinard, J.M., Billuart, P., Vinet, M.C., Koulakoff, A., Carrie, A., Gelot, A., Dupuis, E., Motte, J., Berwald-Netter, Y. *et al.* (1998) A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell*, **92**, 51–61.
5. Gleeson, J.G., Allen, K.M., Fox, J.W., Lamperti, E.D., Berkovic, S., Scheffer, I., Cooper, E.C., Dobyns, W.B., Minnerath, S.R., Ross, M.E. *et al.* (1998) Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell*, **92**, 63–72.
6. Rakic, P. (1971) Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res.*, **33**, 471–476.
7. O'Rourke, N.A., Dailey, M.E., Smith, S.J. and McConnell, S.K. (1992) Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science*, **258**, 299–302.
8. Anderson, S.A., Eisenstat, D.D., Shi, L. and Rubenstein, J.L. (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science*, **278**, 474–476.
9. Marin, O. and Rubenstein, J.L. (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**, 780–790.
10. Meyer, G., Perez-Garcia, C.G. and Gleeson, J.G. (2002) Selective expression of doublecortin and LIS1 in developing human cortex suggests unique modes of neuronal movement. *Cereb. Cortex*, **12**, 1225–1236.
11. Pancoast, M., Dobyns, W. and Golden, J.A. (2005) Interneuron deficits in patients with the Miller–Dieker syndrome. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **109**, 400–404.

12. Letinic, K., Zoncu, R. and Rakic, P. (2002) Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature*, **417**, 645–649.
13. Hirotsune, S., Fleck, M.W., Gambello, M.J., Bix, G.J., Chen, A., Clark, G.D., Ledbetter, D.H., McBain, C.J. and Wynshaw-Boris, A. (1998) Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nat. Genet.*, **19**, 333–339.
14. Cahana, A., Escamez, T., Nowakowski, R.S., Hayes, N.L., Giacobini, M., von Holst, A., Shmueli, O., Sapir, T., McConnell, S.K., Wurst, W. *et al.* (2001) Targeted mutagenesis of Lis1 disrupts cortical development and LIS1 homodimerization. *Proc. Natl Acad. Sci.*, **98**, 6429–6434.
15. Corbo, J.C., Deuel, T.A., Long, J.M., LaPorte, P., Tsai, E., Wynshaw-Boris, A. and Walsh, C.A. (2002) Doublecortin is required in mice for lamination of the hippocampus but not the neocortex. *J. Neurosci.*, **22**, 7548–7557.
16. Gambello, M.J., Darling, D.L., Yingling, J., Tanaka, T., Gleeson, J.G. and Wynshaw-Boris, A. (2003) Multiple dose-dependent effects of Lis1 on cerebral cortical development. *J. Neurosci.*, **23**, 1719–1729.
17. McManus, M.F., Nasrallah, I.M., Pancoast, M.M., Wynshaw-Boris, A. and Golden, J.A. (2004) Lis1 is necessary for normal non-radial migration of inhibitory interneurons. *Am. J. Pathol.*, **165**, 775–784.
18. Bai, J., Ramos, R.L., Ackman, J.B., Thomas, A.M., Lee, R.V. and LoTurco, J.J. (2003) RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat. Neurosci.*, **6**, 1277–1283.
19. Ramos, R.L., Bai, J. and LoTurco, J.J. (2005) Heterotopia formation in rat but not mouse neocortex after RNA interference knockdown of DCX. *Cereb. Cortex*, November 16 Epub ahead of print, PMID 16292002.
20. Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M.C., Friocourt, G., McDonnell, N., Reiner, O., Kahn, A. *et al.* (1999) Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*, **23**, 247–256.
21. Gleeson, J.G., Lin, P.T., Flanagan, L.A. and Walsh, C.A. (1999) Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*, **23**, 257–271.
22. Schaar, B.T., Kinoshita, K. and McConnell, S.K. (2004) Doublecortin microtubule affinity is regulated by a balance of kinase and phosphatase activity at the leading edge of migrating neurons. *Neuron*, **41**, 203–213.
23. Gdalyahu, A., Ghosh, I., Levy, T., Sapir, T., Sapoznik, S., Fishler, Y., Azoulai, D. and Reiner, O. (2004) DCX, a new mediator of the JNK pathway. *EMBO J.*, **23** (4), 823–832.
24. Hoshida, D., Sapir, T., Francis, F., Wolf, S.G., Caspi, M., Elbaum, M., Chelly, J. and Reiner, O. (1999) Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 1599–1610.
25. Tanaka, T., Serneo, F.F., Tseng, H.C., Kulkarni, A.B., Tsai, L.H. and Gleeson, J.G. (2004) Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron*, **41**, 215–227.
26. Tanaka, T., Serneo, F.F., Higgins, C., Gambello, M.J., Wynshaw-Boris, A. and Gleeson, J.G. (2004) Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *J. Cell. Biol.*, **165**, 709–721.
27. Polleux, F., Whitford, K.L., Dijkhuizen, P.A., Vitalis, T. and Ghosh, A. (2002) Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development*, **129**, 3147–3160.
28. Ang, E.S., Jr, Haydar, T.F., Gluncic, V. and Rakic, P. (2003) Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. *J. Neurosci.*, **23**, 5805–5815.
29. Moya, F. and Valdeolmillos, M. (2004) Polarized increase of calcium and nucleokinesis in tangentially migrating neurons. *Cereb. Cortex*, **14**, 610–618.
30. Bellion, A., Baudoin, J.P., Alvarez, C., Bornens, M. and Métin, C. (2005) Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J. Neurosci.*, **25**, 5691–5699.
31. Leneuve, P., Colnot, S., Hamard, G., Francis, F., Niwa-Kawakita, M., Giovannini, M. and Holzenberger, M. (2003) Cre-mediated germline mosaicism: a new transgenic mouse for the selective removal of residual markers from tri-lox conditional alleles. *Nucl. Acid Res.*, **31**, e21–e23.
32. Lavdas, A.A., Grigoriou, M., Pachnis, V. and Parnavelas, J.G. (1999) The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.*, **19**, 7881–7888.
33. Anderson, S.A., Marin, O., Horn, C., Jennings, K. and Rubenstein, J.L. (2001) Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development*, **128**, 353–363.
34. Nadarajah, B., Alifragis, P., Wong, R.O. and Parnavelas, J.G. (2002) Ventricule-directed migration in the developing cerebral cortex. *Nat. Neurosci.*, **5**, 218–224.
35. Métin, C., Baudoin, J.-P., Rakic, S. and Parnavelas, J.G. (2006) Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. *Eur. J. Neurosci.*, **23**, 894–900.
36. Schaar, B.T. and McConnell, S.K. (2005) Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 13652–13657.
37. Altman, J. (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.*, **137**, 433–458.
38. Lois, C., Garcia-Verdugo, J.M. and Alvarez-Buylla, A. (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science*, **271**, 978–981.
39. Friocourt, G., Chafey, P., Billuart, P., Koulakoff, A., Vinet, M.C., Schaar, B.T., McConnell, S.K., Francis, F. and Chelly, J. (2001) Doublecortin interacts with mu subunits of clathrin adaptor complexes in the developing nervous system. *Mol. Cell Neurosci.*, **18**, 307–319.
40. Tabata, H. and Nakajima, K. (2003) Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.*, **23**, 9996–10001.
41. Dent, E.W. and Gertler, F.B. (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron*, **40**, 209–227.
42. Zakharenko, S. and Popov, S. (1998) Dynamics of axonal microtubules regulate the topology of new membrane insertion into the growing neurites. *J. Cell. Biol.*, **143**, 1077–1086.
43. Bouquet, C., Soares, S., von Boxberg, Y., Ravaille-Veron, M., Propst, F. and Nothias, F. (2004) Microtubule-associated protein 1B controls directionality of growth cone migration and axonal branching in regeneration of adult dorsal root ganglia neurons. *J. Neurosci.*, **24**, 7204–7213.
44. Kizhatil, K., Wu, Y.X., Sen, A. and Bennett, V. (2002) A new activity of doublecortin in recognition of the phospho-FIGQY tyrosine in the cytoplasmic domain of neurofascin. *J. Neurosci.*, **22**, 7948–7958.
45. Friocourt, G., Kappeler, C., Saillour, Y., Fauchereau, F., Rodriguez, M.S., Bahi, N., Vinet, M.C., Chafey, P., Poirier, K., Taya, S. *et al.* (2005) Doublecortin interacts with the ubiquitin protease DFFRX, which associates with microtubules in neuronal processes. *Mol. Cell Neurosci.*, **28**, 153–164.
46. Tsukada, M., Prokscha, A., Oldekamp, J. and Eichele, G. (2003) Identification of neurabin II as a novel doublecortin interacting protein. *Mech. Dev.*, **120**, 1033–1043.
47. Tsukada, M., Prokscha, A., Ungewickell, E. and Eichele, G. (2005) Doublecortin association with actin filaments is regulated by neurabin II. *J. Biol. Chem.*, **280**, 11361–11368.
48. Cobos, I., Calgagnotto, M.E., Vilaythong, A.J., Thwin, M.T., Noebels, J.L., Baraban, S.C. and Rubenstein, J.L.R. (2005) Mice lacking Dlx1 show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. *Nat. Neurosci.*, **8**, 1059–1068.
49. Chazal, G., Durbec, P., Jankovski, A., Rougon, G. and Cremer, H. (2000) Consequences of the neural cell adhesion molecule deficiency on cell migration in the rostral migratory stream of the mouse. *J. Neurosci.*, **20**, 1446–1457.
50. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edn.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
51. Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T. and Nishimune, Y. (1997) ‘Green mice’ as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.*, **407**, 313–319.
52. de Bergeyck, V., Naerhuyzen, B., Goffinet, A.M. and Lambert de Rouvroit, C. (1998) A panel of monoclonal antibodies against reelin, the extracellular matrix protein defective in reeler mutant mice. *J. Neurosci. Meth.*, **82**, 17–24.
53. Poirier, K., Van Esch, H., Friocourt, G., Saillour, Y., Bahi, N., Backer, S., Souil, E., Castelnau-Ptakhine, L., Beldjord, C., Francis, F. *et al.* (2004) Neuroanatomical distribution of ARX in brain and its localisation in GABAergic neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **122**, 35–46.
54. Alifragis, P., Parnavelas, J.G. and Nadarajah, B. (2002) A novel method of labeling and characterizing migrating neurons in the developing central nervous system. *Exp. Neurol.*, **174**, 259–265.

## REVIEW ARTICLE

## Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons

Christine Métin,<sup>1,2</sup> Jean-Pierre Baudoin,<sup>1,2</sup> Sonja Rakić<sup>3</sup> and John G. Parnavelas<sup>3</sup><sup>1</sup>Developpement Normal et Pathologique du Cerveau, INSERM, U616, 47 Boulevard de l'Hôpital, F-75651 Paris Cédex 13, France<sup>2</sup>IFR 70, Université Pierre et Marie Curie, Hôpital de la Salpêtrière, F-75651 Paris Cédex 13, France<sup>3</sup>Department of Anatomy and Developmental Biology, University College London, London WC1E 6BT, UK**Keywords:** cortical development, genes, interneurons, migration, neurite extension, nucleus and cytoplasm translocation

## Abstract

Since the discovery that the vast majority of the GABA-containing interneurons of the cerebral cortex arise in the subpallium, considerable effort has been put into the description of the precise origin of these neurons in subdivisions of the ganglionic eminence and in the migratory routes they follow on their way to the developing cortex. More recently, studies have focused on the molecular and cellular mechanisms that guide their migration. Investigations of the molecular mechanisms involved have demonstrated important roles for numerous transcription factors, motogenic factors and guidance molecules. Here, we review results of very recent analyses of the underlying cellular mechanisms and specifically of the movement of the nucleus, cytoplasmic components and neuritic processes during interneuron migration.

## Origins of interneurons and migratory routes

It has been 10 years since the surprising observation that neurons arising in the ganglionic eminence of the subpallium migrate to the developing pallium (De Carlos *et al.*, 1996; Tamamaki *et al.*, 1997). Tracing studies have since confirmed these observations and demonstrated that these migrating cells are GABA-containing interneurons destined not only for the neocortex but also for the hippocampus and olfactory bulb (Anderson *et al.*, 1997; Lavdas *et al.*, 1999; Wichterle *et al.*, 1999; Pleasure *et al.*, 2000; Wichterle *et al.*, 2001). These tracing studies identified two different streams of interneurons to round the corticostriatal notch and follow tangentially orientated paths to enter the cortex (reviewed by Corbin *et al.*, 2001; Nadarajah & Parnavelas, 2002; Marin & Rubenstein, 2003). An early cohort [embryonic day (E)12 in mouse, E14 in rat], originating in the medial ganglionic eminence (MGE), innervates mainly the preplate. These cells are tangentially orientated and many show features typical of Cajal–Retzius cells. A second and more prominent cohort, composed also of MGE cells, has been observed to migrate predominantly through the intermediate zone (IZ) slightly later in development (E13–15 mouse, E15–17 rat). At the late stages of corticogenesis, cells originating mostly in the lateral ganglionic eminence (LGE), but also in the MGE, appear in the lower IZ and subventricular zone (SVZ) (Anderson *et al.*, 2001). However, more recent studies pointed to the presence of other sources of cortical interneurons. Thus, a tracer study by Jimenez *et al.* (2002) demonstrated the contribution of the LGE to the cortical interneuron population from the early stages of corticogenesis. Further, the *in vivo* fate mapping studies of Nery *et al.* (2002) have shown that the caudal ganglionic eminence (CGE), although

distinct in many ways from the LGE and MGE, is an additional source of tangentially migrating interneurons to the cortex and hippocampus.

The three-dimensional migratory profiles of interneurons derived from the ganglionic eminence, especially the CGE, were until recently largely unknown. This question was recently addressed by Nakajima and colleagues (Yozu *et al.*, 2005) through the use of focal electroporation into small, defined portions of the telencephalic hemispheres. Using this technique in combination with whole-mount telencephalic hemisphere cultures, they were able to visualize the migration of interneurons derived from specific parts of the ganglionic eminence. They observed that while MGE cells migrated laterally and spread widely throughout the cortex, most CGE cells migrated toward the caudal-most end of the telencephalon; some cells were seen to migrate laterally and rostrally (Fig. 1B). Their migration was nearly twice as fast (109  $\mu\text{m}/\text{h}$ ) as the tangentially migrating MGE cells (50–60  $\mu\text{m}/\text{h}$ ; Polleux *et al.*, 2002). Additional transplantation experiments suggested that the mechanisms controlling the direction of migration of MGE and CGE cells from the subpallium to the cortex were distinct from each other. These mechanisms were determined through a combination of local environment and cell-intrinsic mechanisms in the migrating ganglionic eminence cells at the early stages of cortical formation. This is consistent with the results of the *in vivo* fate-mapping studies of Nery *et al.* (2002).

The existence of distinct sources of cortical interneurons has raised the question whether distinct subtypes are derived from each of the identified sources in the ventral telencephalon. Cortical interneurons show remarkable diversity of distinct subtypes identified by morphological, physiological and molecular properties (Cajal, 1911; Parnavelas *et al.*, 1989; Cauli *et al.*, 1997; Kawaguchi & Kubota, 1997). The question was recently addressed by Xu and colleagues (Xu *et al.*, 2004) with the use of *in vitro* transplantation assays and analysis of *Nkx2.1* mutants. These studies provided evidence, and in accord with

Correspondence: Dr John Parnavelas, as above.

E-mail: j.parnavelas@ucl.ac.uk

Received 21 October 2005, revised 7 December 2005, accepted 8 December 2005



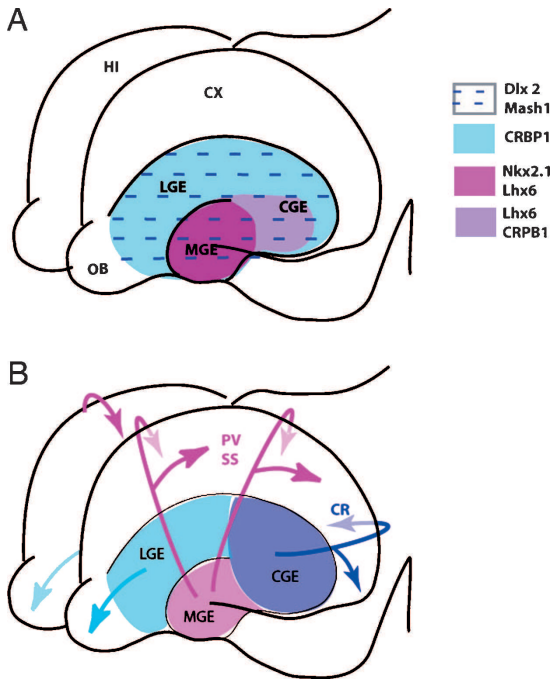


FIG. 1. (A) The ganglionic eminence (GE) of the subpallium is subdivided into three regions: lateral (LGE), medial (MGE), and caudal (CGE) according to the expression patterns of various transcription factors (*Dlx2*, *Mash1*, *Nkx2.1* and *Lhx6*) and of the cellular retinol-binding protein 1 (CRBP1) (after Nery *et al.*, 2002). (B) Main migratory paths of interneurons derived from the three subdivisions of the GE (Nery *et al.*, 2002; Yozu *et al.*, 2005). MGE cells tend to migrate laterally and spread throughout the cortex, CGE cells migrate predominantly towards the caudal telencephalon, whereas LGE cells migrate rostrally and contribute to interneurons in the olfactory bulb. It has been suggested that most MGE cells differentiate into parvalbumin (PV)- and somatostatin (SS)-immunoreactive interneurons, whereas most CGE cells differentiate into calretinin (CR) interneurons (Xu *et al.*, 2004). CX, cerebral cortex; HI, hippocampus; OB, olfactory bulb.

earlier observations (Wichterle *et al.*, 2001; Valcanis & Tan, 2003), that somatostatin- and parvalbumin-expressing interneurons derive for the most part from the MGE, while calretinin-containing cells arise predominantly in the CGE (Fig. 1B).

Little is known about the substrates used by interneurons to reach the cortex. However, a close association has been observed between tangentially orientated cells and corticofugal axons, predominantly in the IZ and marginal zone (MZ) of the developing cortex (Métin & Godemas, 1996; Parnavelas, 2000), suggesting that interneurons may use this axonal system as a scaffold for their migration into the cortex. However, other authors (Tanaka *et al.*, 2003) have failed to note such an association. More recent investigations have provided evidence in support of the notion that the TAG-1-expressing corticofugal fibers serve as a substrate upon which the GABA-containing cortical interneurons migrate (Denaxa *et al.*, 2001; Morante-Oria *et al.*, 2003; McManus *et al.*, 2004). Blocking TAG-1 function in cortical slices with anti-TAG-1 antibodies or soluble TAG-1 protein has resulted in marked reduction of migrating GABAergic interneurons (Denaxa *et al.*, 2001). However, a recent analysis by Denaxa *et al.* (2005) did not show an interneuron migration defect in TAG-1-null mice.

If tangentially migrating neurons use the corticofugal system to enter the neocortex, how do they migrate into specific layers with their pyramidal counterparts? Using time-lapse imaging of cortical slices together with tracer-labelling techniques, Nadarajah *et al.* (2002) have shown that interneurons arising in the ventral telencephalon actively migrate towards the cortical VZ upon reaching the dorsal telencephalon, a mode of movement that has been termed 'ventricle-directed migration'. After a pause in this proliferative zone, they migrate radially in the direction of the pial surface to take up positions in the developing cortical plate (CP). A more recent study (Ang *et al.*, 2003), using time-lapse multiphoton microscopy, focused on the interneurons that follow the stream from the ganglionic eminence to the MZ, particularly at the early stages of corticogenesis. Imaging of the surface of the cerebral hemispheres in both explant cultures and brains of living mouse embryos showed interneurons descending into the underlying cortex to assume positions with isochronically generated, radially derived neurons. It appears therefore that once interneurons reach the neocortex, either through the MZ or the IZ/SVZ streams, they migrate radially in the final stage of their journey within the cortex to take up their positions in the appropriate layers (Polleux *et al.*, 2002; Ang *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003; Hevner *et al.*, 2004; Fig. 2). It is not known at present whether 'intracortical' interneuron migration is neurophilic (e.g. communication with projection neurons

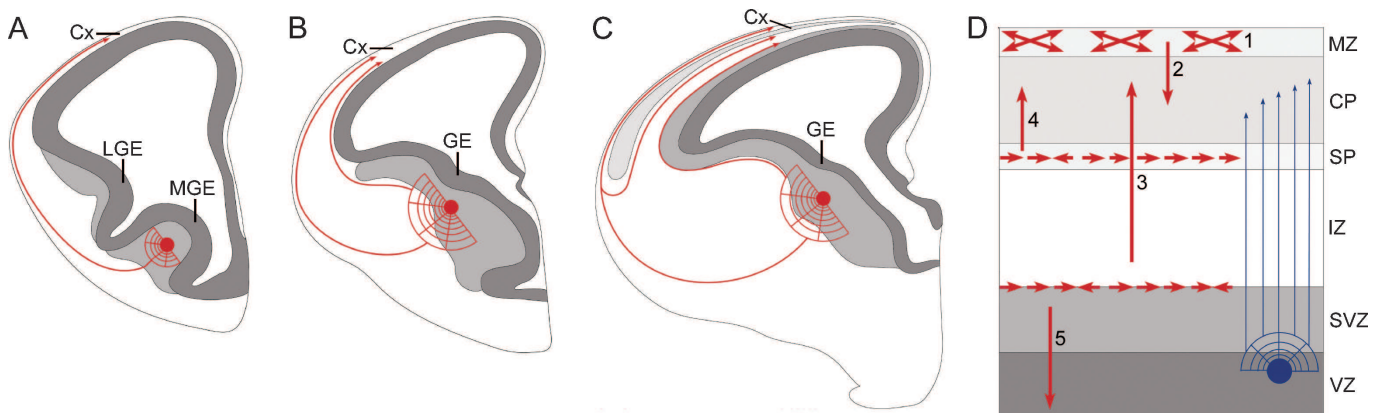


FIG. 2. Cortical interneurons (red) originate in the GE of the subpallium and follow tangential migratory routes to enter the cortex. (A) At the early stages they appear almost exclusively in the MZ while (B and C) at later stages the routes are at the level(s) of IZ/SVZ and SP (after the split of the MZ). (D) In the MZ, interneurons (1) show varying orientations and (2) enter the developing CP by inward migration. Cells that enter the cortex through the lower streams migrate to the CP (3 and 4) directly or (5) after a short pause in the VZ. Pyramidal cells (blue) are of pallial origin and migrate radially to their positions in the CP. Cx, cerebral cortex; lateral (LGE) and medial (MGE) ganglionic eminence (GE); MZ, marginal zone; CP, cortical plate; SP, subplate; IZ, intermediate zone; SVZ, subventricular zone; VZ, ventricular zone. Drawings are modified from Altman & Bayer (1995).

of the same age or Cajal–Retzius cells) and/or gliophilic (e.g. communication with radial glia).

It is widely believed that, similar to pyramidal cells, cortical interneurons are disposed in an ‘inside-out’ pattern within the developing cortex. Furthermore, it is believed that contemporaneously born interneurons and pyramidal cells reside within the same layer (Ang *et al.*, 2003; Miller, 1985; Fairen *et al.*, 1986; Pедуzzi, 1988; Valcanis & Tan, 2003; Hevner *et al.*, 2004), although this view is not shared by all (Yozu *et al.*, 2004). It may be that the laminar position of interneurons is determined by interactions with contemporaneously born projection neurons. However, a recent study (Alcantara *et al.*, 2005) has suggested that interneurons may regulate the laminar fate of their pyramidal counterparts. Specifically, these authors proposed that Reelin secreted by interneurons residing in the lower cortical layers probably influence the migration of late-born pyramidal cells of the upper cortical layers.

### Molecular mechanisms in interneuron migration

The molecular mechanisms that guide the migration of interneurons from the ganglionic eminence, around the corticostriatal notch and into the cortex are the subject of intensive investigations at present, but numerous transcription factors, motogenic factors, neurotrophic factors and other molecules have already been demonstrated to play important roles (Fig. 1A). Much of this work is outlined in the most recent comprehensive review on the subject by Marin & Rubenstein (2003). In this review, we shall focus on more recent findings.

Motogenic factors in the MGE and repulsive factors in the ventralmost telencephalon and LGE, as well as attractive and permissive factors in the cortex, dictate the migration of GABAergic interneurons into the cortex. One of the molecules that has been shown to stimulate motogenic activity in these neurons is hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) acting through its receptor MET (Powell *et al.*, 2001). Disruption of the normal expression of HGF/SF appears to result in undirected scattering of cells from the ganglionic eminence and in a significant reduction of interneurons in the cortex at the time of birth. Neurotrophins, such as brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4 (Polleux *et al.*, 2002) and glial cell line-derived neurotrophic factor (Pozas & Ibanez, 2005), have been observed to stimulate the migration of cortical interneurons and are also considered potent motogenic factors.

Studies by Marin and colleagues (Marin *et al.*, 2001) have shown that interneurons destined to populate the cortex express neuropilin (Npn)1 and Npn2, which enable them to respond to chemorepulsion produced by class 3 semaphorins in the striatal mantle. Further, their data suggested that the repulsive activity of semaphorins in the developing striatum would create an exclusion zone for migrating interneurons and channel them into adjacent paths, leading to the formation of their migratory routes in the cortex. However, recent work in our laboratory aimed to examine the role of Slit/Robo signalling in interneuron migration, has indicated that Robo1 is required to keep the cells originating in the MGE clear of the striatum on their way to the cortex (W. Andrews, A. Liapi, C. Planchez, L. Camurri, J. Zhang, S. Mori, F. Murakami, J.G. Parnavelas, V. Sundaresan and L.J. Richards, unpublished observations). However, it has been reported that neurons avoid the striatal area in Slit1/Slit2 double-mutant mice (Marin *et al.*, 2003), indicating that this may be a Slit-independent event. Taken together, these observations suggest that both Npn/Sema and Robo1 signalling are required to steer interneurons around the striatum and into the neocortex.

Similar to semaphorins, neuregulins (NRGs), a family of growth factors important for the development of neuronal and glial cells in the

nervous system (Falls, 2003), are also involved in sorting out the migratory trajectory of cortical interneurons. To date, we know of four NRGs that signal by binding to the tyrosine kinase receptor family termed ErbB (Buonanno & Fischbach, 2001). NRG1 is widely expressed in the developing nervous system, and several lines of evidence support the notion that it regulates cortical interneuron migration. Thus, it has been shown *in vitro* that NRG1 is a chemoattractant for MGE-derived cells (Flames *et al.*, 2004). Further, soluble NRG1-Ig is expressed in the cortical proliferative zones (Flames *et al.*, 2004), suggesting a role for secreted NRG1 in attracting the subventricular stream of tangentially migrating interneurons. NRG1-CRD, a membrane-bound form of NRG1, is expressed in the ganglionic eminence and probably facilitates migration of interneurons through it (Flames *et al.*, 2004). The NRG receptor ErbB4 is expressed on migrating cortical interneurons and colocalizes with the interneuron marker DLX2 (Yau *et al.*, 2003). An *in vitro* loss-of-function experiment, using a dominant negative form of ErbB4 receptor lacking the tyrosine kinase domain, demonstrated an ErbB4-dependent migration of cortical interneurons from the MGE. Furthermore, a reduced number of cortical GABAergic interneurons in the adult cortex has been reported in conditional *ErbB4* mutants (Flames *et al.*, 2004).

Neurons of the MGE destined for the developing cortex express the LIM homeodomain gene *lhx6* (Lavdas *et al.*, 1999). Overlapping domains of *lhx6* expression and of the structurally related *lhx7* have been detected in the MGE of mouse and rat embryos (Grigoriou *et al.*, 1998; Asbreuk *et al.*, 2002). A number of studies (Asbreuk *et al.*, 2002; Marin *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2003) have suggested an important role for *lhx7* in the development of the cholinergic neurons in the forebrain. As for *lhx6*, its expression in migrating interneurons has led to the hypothesis that this gene uniquely or in combination with other transcription factors might play a role in the decision of MGE cells to migrate to the cortex. The hypothesis was tested with the method of RNA interference in embryonic brain slices (Alifragis *et al.*, 2004). These experiments demonstrated that silencing *lhx6* drastically impeded the migration of interneurons from the MGE into the cortex, although it did not obstruct their dispersion within the ventral telencephalon. Further, blocking *lhx6* expression in dissociated MGE cultured neurons did not interfere with the production of GABA or its synthesizing enzyme. These results indicate that *lhx6*, unlike *lhx7*, does not regulate neurotransmitter choice in interneurons but plays an important role in their migration from the ventral telencephalon to the neocortex.

### Cellular mechanisms of interneuron migration

In contrast to cortical pyramidal neurons that tightly adhere to glial processes and show a rather simple bipolar morphology (Rakic, 1972), migrating interneuron precursors extend numerous branches at their front and are able to move from one substrate to another (Marin & Rubenstein, 2001; Nadarajah & Parnavelas, 2002; Polleux *et al.*, 2002). Indeed, MGE cells migrate on cell bodies of postmitotic neurons in the CP, on progenitors in the SVZ, along processes of radial glial cells and among corticofugal axons in the lower IZ (Denaxa *et al.*, 2001; Nadarajah *et al.*, 2002). However, because MGE cells later differentiate into a variety of cortical interneuron types (DeFelipe, 1993; Flames & Marin, 2005), we cannot exclude the possibility that certain types of progenitors prefer specific substrates.

Similar to SVZ astrocyte precursors, MGE cells turn by extending new processes in new directions rather than re-orienting the trajectory of their leading growth cone (Kakita & Goldman, 1999). Thus, the leading process of MGE cells behaves as a sensor



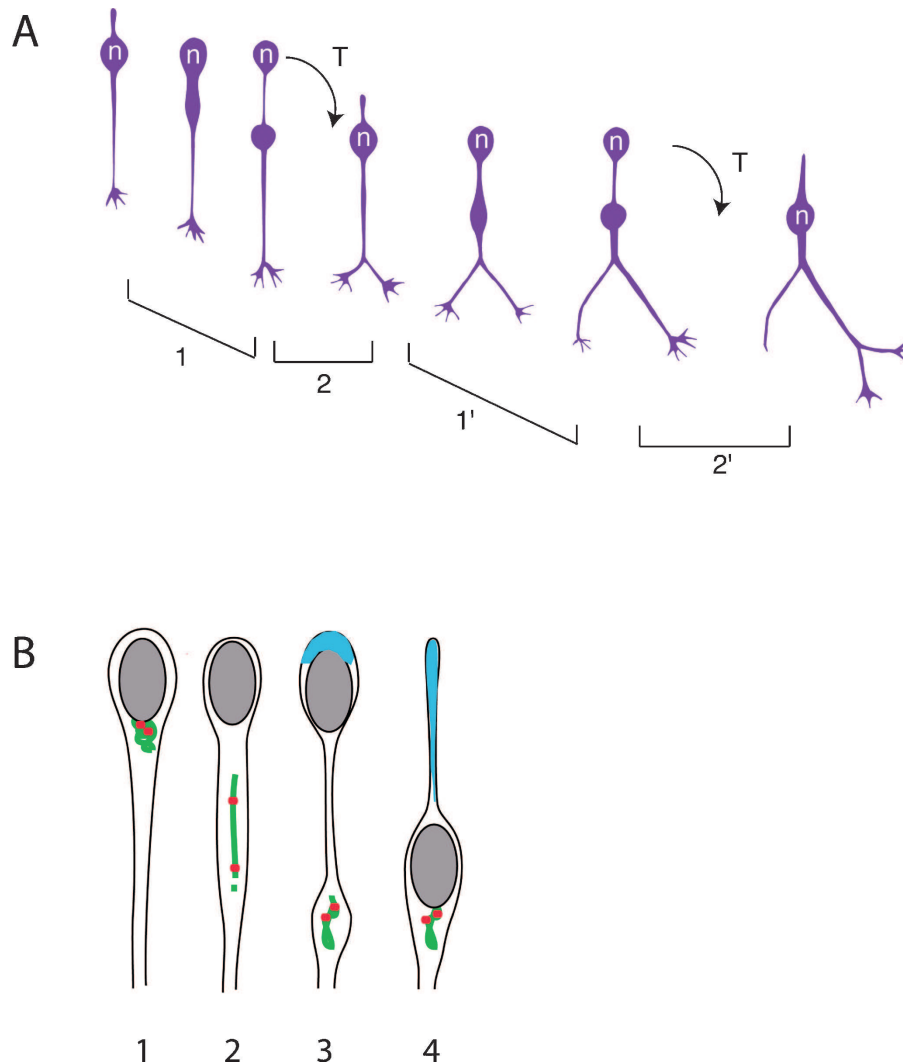


FIG. 3. (A) Changes in morphology of MGE cells migrating on cortical cells. During migration, MGE cells regularly split their leading growth cone and produce new branches at their front. Neurite outgrowth is highly dynamic. Following leading growth cone splitting, MGE cells quickly extend diverging paired branches. Then, one branch is retracted; the other one further divides and receives the nucleus. The nucleus (n) at the rear of the cell shows intermittent movements. Dynamic forward translocations (2 and 2') alternate with long resting phases (1 and 1'; see below). The nucleus migrates toward a swelling that differentiates in the leading neurite during the resting phase. Growth cones stop their migration and often split during nuclear translocations, whereas leading neurite(s) elongate(s) during resting phases. (B) Forward translocation of the centrosome and of the Golgi apparatus precedes each nuclear translocation. The Golgi apparatus (in green) and centrioles (in red) are tightly associated and migrate rostrally in the leading neurite during the resting phase of the nucleus (in grey). They form a swelling 20  $\mu\text{m}$  away from the nucleus (1, 2 and 3). This forward movement is associated with striking morphological changes: the Golgi apparatus elongates and the centrioles split. Myosin II (in blue) accumulates at the rear of the nucleus during the resting phase of the nucleus (3) and contributes to the forward movement of the nucleus toward the centrosome and Golgi apparatus (4).

able to differentiate growth cones and to make steering decisions along its whole length (Polleux *et al.*, 2002). Moreover, MGE cells regularly split the growth cone at the tip of their leading neurite, extending paired diverging branches at their front (Fig. 3A; also Bellion *et al.*, 2005). One out of the two branches is then retracted and the other one divides further. This behaviour is highly dynamic and MGE cells can thus integrate guidance cues from the tips of several diverging processes, i.e. from several discrete zones distributed over a large region ahead of their cell bodies, before selecting one direction of migration.

Another strategy used by MGE cells to change their direction of migration is to reverse their polarity, as do cells with simpler bipolar morphology. This behaviour has been imaged in organotypic slices, when MGE cells seek the VZ (Nadarajah *et al.*, 2002). It has also been observed when pyramidal neurons generated at later stages seek the

VZ (Noctor *et al.*, 2004). Cues triggering polarity reversal are not restricted to the VZ as MGE cells migrating tangentially to the pial surface in organotypic slices can reverse their direction of migration (Bellion *et al.*, 2005; C. Métin, unpublished observations). Interestingly, isolated interneurons maintained *in vitro* extend processes at the two opposite poles of their soma and alternatively translocate their cell body in each process (Hayashi *et al.*, 2003).

#### *The two-step migration cycle of cortical interneurons*

Like other motile cells, neurons progress in their environment by repeating a cycle of transformations that comprises two or three main phases (Lauffenburger & Horwitz, 1996; Lambert de Rouvroit & Goffinet, 2001; Ridley *et al.*, 2003): (i) extension of protrusions at the

front of the cell; (ii) forward translocation of the nucleus and perinuclear cytoplasm; and (iii) retraction of the trailing process, sometimes grouped with the second phase. In spite of the complex morphological transformations at their leading edge, moving MGE cells present a clear two-step nucleokinesis responsible for the saltatory progression of their cell body. The nucleus alternates resting phases that correlate with leading neurite elongation and moving phases associated with a pause in neurite elongation and, eventually, growth cone splitting (Bellion *et al.*, 2005; Moya & Valdeolmillos, 2004). These two steps are clearly dissociated in time and easier to identify than in neurons migrating along radial glia (Edmondson & Hatten, 1987; Rivas & Hatten, 1995). A remarkable property of MGE cells is that, during the resting phase of the nucleus, the centrosome (or microtubule organizing centre; MTOC) separates from the nucleus and migrates forward into the leading process (Fig. 3B, Bellion *et al.*, 2005). Forward movements of the centrosome and nucleus are thus dissociated in time and clearly succeed each other. A transient increase in intracellular calcium has been observed in the swelling that contains the MTOC prior to or during nuclear translocation (Moya & Valdeolmillos, 2004), suggesting that calcium signalling might regulate a particular phase in this two-step process.

In cerebellar neurons that migrate along radial glial cells, small-amplitude movement of the centrosome relative to the nucleus (1  $\mu\text{m}$ ) and short temporal delay between the two movements have been reported (Solecki *et al.*, 2004). In MGE cells, as in cerebellar neurons, it seems important for nuclear movements to be preceded by centrosomal movements. Centrosome positioning has been shown to stabilize polarized structures in migrating cells (Ueda *et al.*, 1997; Sanchez-Madrid & del Pozo, 1999). The mechanisms controlling cell polarity and those controlling centrosome positioning might be tightly linked in migrating neurons. Indeed, Par6/PKC complexes that are involved in the polarization of a large variety of cells, from invertebrates to mammals (Henrique & Schweisguth, 2003; Etienne-Manneville & Hall, 2003a; Etienne-Manneville & Hall, 2003b), have been detected in the centrosome of cerebellar neurons migrating along radial glial cells (Solecki *et al.*, 2004). In these cells, normal function of Par6 is crucial for regulating centrosomal movements and for the integrity of the microtubules surrounding the nucleus.

#### *Role of microtubules and myosin II*

The organization of the network of perinuclear microtubules that probably mediates physical interactions between the nucleus and the centrosome (Rivas & Hatten, 1995; Solecki *et al.*, 2004) remains to be analysed in MGE cells. Because the distance between the centrosome and nucleus varies greatly during each migration cycle, a complex regulation of the nuclear-centrosome coupling should occur in these neurons. Ninein, a centrosomal protein anchoring microtubules on the father centriole (Abal *et al.*, 2002; Bornens, 2002), is located in the centrosome of resting MGE cells but disappears from the centrosome when these cells are induced to migrate (Bellion *et al.*, 2005). This surprising observation suggests that microtubules are more loosely anchored to the centrosome in migrating than in stationary cells. Microtubule-associated proteins are typically involved in controlling the microtubule-mediated physical interactions between the nucleus and centrosome. Fak, a substrate for cdk5 phosphorylation localized on microtubules, is also an important regulator of nuclear positioning (Xie *et al.*, 2003). In cerebellar neurons, interactions between proteins in the LIS1 complex and perhaps also Doublecortin control the distance between the nucleus and the centrosome (Tanaka *et al.*, 2004; review in Bielas & Gleeson, 2004). In LIS1-mutant mice, cortical interneurons migrate shorter distances than in control mice, suggesting that LIS1, perhaps functioning at the nucleus and/or centrosome, is

involved in controlling the migration speed of tangentially migrating cells (McManus *et al.*, 2004).

The long-distance forward migration of the centrosome observed in MGE cells is associated with the splitting and redistribution of the two centrioles along the migration axis (Bellion *et al.*, 2005). This puzzling behaviour could perhaps be associated with a functional asymmetry of the two centrioles. Such splitting of the centrosome had been described in migrating non-neuronal cells (Schliwa *et al.*, 1982; Piel *et al.*, 2000). In these cells, centriole dissociation was directly related to the control of cell motility. Whether centrosome splitting is specific to tangentially migrating neurons or whether it occurs in all migrating neurons remains to be determined. This phenomenon has not been described in cerebellar granule cells migrating along radial glial cells *in vitro*. However, relative movements of the two centrioles might be difficult to detect in these neurons due to limited amplitude of the forward movements of the centrosome (Solecki *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2004). Further studies are required to shed light on this interesting phenomenon.

In MGE cells, the centrioles and Golgi apparatus remain tightly linked during forward migration and both elongate along the migration axis. Biochemical studies show that the Golgi apparatus is dynamically maintained around the centrosome by molecular motors associated with microtubules and by a variety of additional proteins (Chabin-Brion *et al.*, 2001; Rios *et al.*, 2004; review in Rios & Bornens, 2003). Accordingly, in adherent cells such as fibroblasts or astrocytes induced to migrate in scratch-wound assays, the Golgi apparatus repositions with the centrosome in front of the nucleus, in the direction of movement (Kupfer *et al.*, 1982; Etienne-Manneville & Hall, 2001; Palazzo *et al.*, 2001; Magdalena *et al.*, 2003). The phase of rostral positioning of the Golgi apparatus could correspond to an active phase of membrane exocytosis directing vesicles towards the leading edge through a process dependent on microtubule-associated motors. Indeed, in polarized fibroblasts migrating in scratch-wound assays, nocodazole treatment displaces exocytosis to perinuclear regions near the Golgi apparatus (Prigozhina & Waterman-Storer, 2004; Schmoranz *et al.*, 2003). Thus exocytosis and vesicle transport mechanisms, dependent on the Golgi apparatus, are probably highly important in interneuron migration.

Finally, the long-distance forward migration of the centrosome observed in MGE cells during migration suggests that cytoskeletal components, other than microtubules, control nuclear movements. Non-muscle myosin II filaments accumulate at the rear of the nucleus in migrating MGE cells, and blebbistatin, a specific inhibitor of nonmuscle myosin II ATPase (Straight *et al.*, 2003), impairs the nuclear translocation in these neurons (Bellion *et al.*, 2005). Migration defects or position abnormalities in neurons of the cerebellum, pons, reticular nucleus and facial nucleus have been described in a mouse hypomorphic for nonmuscle myosin IIB, an isoform of myosin II enriched in neurons (Ma *et al.*, 2004). Using an *in vitro* assay, McConnell and colleagues have recently demonstrated the implication of myosin II in controlling nucleokinesis in SVZ cell migration (Schaar & McConnell, 2005). Altogether, these observations suggest a significant contribution of nonmuscle myosin II to nucleokinesis in neuronal populations, specifically in cortical interneuron precursors, though its precise role remains to be elucidated.

#### Concluding remarks

The mechanisms of interneuron precursor migration have only just begun to be elucidated. MGE cells have been investigated with regard to the outgrowth, splitting and retraction of the leading process, the position of the centrosome and the movement of the nucleus. Studying the role of the various cytoskeletal components in this cell type will

reveal the critical molecules involved in these processes and help to elucidate how they are linked together. The temporal considerations between migration and subsequent differentiation into each particular type of interneuron remain to be revealed, as well as the mechanisms leading to the conversion from tangential to radial modes of migration.

## Acknowledgements

The work was supported by EU grant QLG3-CT-2000-00158 and a Wellcome Trust grant (059370) to J.G.P., and by grants from the Fondation pour la Recherche sur le Cerveau and Fondation Jérôme Lejeune to C.M.

## Abbreviations

CGE, caudal ganglionic eminence; CP, cortical plate; HGF/SF, hepatocyte growth factor/scatter factor; IZ, intermediate zone; LGE, lateral ganglionic eminence; MGE, medial ganglionic eminence; MZ, marginal zone; Npn, neuropilin; NRGs, neuregulins; SVZ, subventricular zone.

## References

- Abal, M., Piel, M., Bouckson-Castaing, V., Mogensen, M., Sibarita, J.B. & Bornens, M. (2002) Microtubule release from the centrosome in migrating cells. *J. Cell Biol.*, **159**, 731–737.
- Alcantara, S., Pozas, E., Ibanez, C.F. & Soriano, E. (2005) BDNF-modulated spatial organization of Cajal-Retzius and GABAergic neurons in the marginal zone plays a role in the development of cortical organization. *Cereb. Cortex*, in press.
- Alifragis, P., Liapi, A. & Parnavelas, J.G. (2004) Lhx6 regulates the migration of cortical interneurons from the ventral telencephalon but does not specify their GABA phenotype. *J. Neurosci.*, **24**, 5643–5648.
- Altman, J.S. & Bayer, S.A. (1995) *Prenatal Rat Brain Development*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Anderson, S.A., Eisenstat, D.D., Shi, L. & Rubenstein, J.L. (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes [see comments]. *Science*, **278**, 474–476.
- Anderson, S.A., Marin, O., Horn, C., Jennings, K. & Rubenstein, J.L. (2001) Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development*, **128**, 353–363.
- Ang, E.S. Jr, Haydar, T.F., Gluncic, V. & Rakic, P. (2003) Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. *J. Neurosci.*, **23**, 5805–5815.
- Asbreuk, C.H., van Schaick, H.S., Cox, J.J., Kromkamp, M., Smidt, M.P. & Burbach, J.P. (2002) The homeobox genes *Lhx7* and *Gbx1* are expressed in the basal forebrain cholinergic system. *Neuroscience*, **109**, 287–298.
- Bellion, A., Baudoin, J.P., Alvarez, C., Bornens, M. & Metin, C. (2005) Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J. Neurosci.*, **25**, 5691–5699.
- Bielas, S.L. & Gleeson, J.G. (2004) Cytoskeletal-associated proteins in the migration of cortical neurons. *J. Neurobiol.*, **58**, 149–159.
- Bornens, M. (2002) Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **14**, 25–34.
- Buonanno, A. & Fischbach, G.D. (2001) Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **11**, 287–296.
- Cajal, S.R. (1911) *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. Maloine, Paris.
- Cauli, B., Audinat, E., Lambolez, B., Angulo, M.C., Ropert, N., Tsuzuki, K., Hestrin, S. & Rossier, J. (1997) Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J. Neurosci.*, **17**, 3894–3906.
- Chabin-Brion, K., Marceiller, J., Perez, F., Settegrana, C., Drechou, A., Durand, G. & Pous, C. (2001) The Golgi complex is a microtubule-organizing organelle. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 2047–2060.
- Corbin, J.G., Nery, S. & Fishell, G. (2001) Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain. *Nat. Neurosci.*, **4**, 1177–1182.
- De Carlos, J.A., Lopez-Mascaraque, L. & Valverde, F. (1996) Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J. Neurosci.*, **16**, 6146–6156.
- DeFelipe, J. (1993) Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cereb. Cortex*, **3**, 273–289.
- Denaxa, M., Chan, C.H., Schachner, M., Parnavelas, J.G. & Karagozeos, D. (2001) The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development*, **128**, 4635–4644.
- Denaxa, M., Kyriakopoulou, K., Theodorakis, K., Trichas, G., Vidaki, M., Takeda, Y., Watanabe, K. & Karagozeos, D. (2005) The adhesion molecule TAG-1 is required for proper migration of the superficial migratory stream in the medulla but not of cortical interneurons. *Dev. Biol.*, **288**, 87–99.
- Edmondson, J.C. & Hatten, M.E. (1987) Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high-resolution time-lapse video microscopic study. *J. Neurosci.*, **7**, 1928–1934.
- Etienne-Manneville, S. & Hall, A. (2001) Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC $\zeta$ . *Cell*, **106**, 489–498.
- Etienne-Manneville, S. & Hall, A. (2003a) Cdc42 regulates GSK-3 $\beta$  and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature*, **421**, 753–756.
- Etienne-Manneville, S. & Hall, A. (2003b) Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**, 67–72.
- Fairen, A., Cobas, A. & Fonseca, M. (1986) Times of generation of glutamic acid decarboxylase immunoreactive neurons in mouse somatosensory cortex. *J. Comp. Neurol.*, **251**, 67–83.
- Falls, D.L. (2003) Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp. Cell Res.*, **284**, 14–30.
- Flames, N., Long, J.E., Garratt, A.N., Fischer, T.M., Gassmann, M., Birchmeier, C., Lai, C., Rubenstein, J.L. & Marin, O. (2004) Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron*, **44**, 251–261.
- Flames, N. & Marin, O. (2005) Developmental mechanisms underlying the generation of cortical interneuron diversity. *Neuron*, **46**, 377–381.
- Grigoriou, M., Tucker, A.S., Sharpe, P.T. & Pachnis, V. (1998) Expression and regulation of *Lhx6* and *Lhx7*, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development. *Development*, **125**, 2063–2074.
- Hayashi, K., Kawai-Hirai, R., Harada, A. & Takata, K. (2003) Inhibitory neurons from fetal rat cerebral cortex exert delayed axon formation and active migration in vitro. *J. Cell Sci.*, **116**, 4419–4428.
- Henrique, D. & Schweisguth, F. (2003) Cell polarity: the ups and downs of the Par6/aPKC complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **13**, 341–350.
- Hevner, R.F., Daza, R.A., Englund, C., Kohtz, J. & Fink, A. (2004) Postnatal shifts of interneuron position in the neocortex of normal and reeler mice: evidence for inward radial migration. *Neuroscience*, **124**, 605–618.
- Jimenez, D., Lopez-Mascaraque, L.M., Valverde, F. & De Carlos, J.A. (2002) Tangential migration in neocortical development. *Dev. Biol.*, **244**, 155–169.
- Kakita, A. & Goldman, J.E. (1999) Patterns and dynamics of SVZ cell migration in the postnatal forebrain: monitoring living progenitors in slice preparations. *Neuron*, **23**, 461–472.
- Kawaguchi, Y. & Kubota, Y. (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb. Cortex*, **7**, 476–486.
- Kupfer, A., Louvard, D. & Singer, S.J. (1982) Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in cultured fibroblasts at the edge of an experimental wound. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **79**, 2603–2607.
- Lambert de Rouvroit, C. & Goffinet, A.M. (2001) Neuronal migration. *Mech. Dev.*, **105**, 47–56.
- Lauffenburger, D.A. & Horwitz, A.F. (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, **84**, 359–369.
- Lavdas, A.A., Grigoriou, M., Pachnis, V. & Parnavelas, J.G. (1999) The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.*, **19**, 7881–7888.
- Ma, X., Kawamoto, S., Hara, Y. & Adelstein, R.S. (2004) A point mutation in the motor domain of nonmuscle myosin II-B impairs migration of distinct groups of neurons. *Mol. Biol. Cell*, **15**, 2568–2579.
- Magdalena, J., Millard, T.H. & Machesky, L.M. (2003) Microtubule involvement in NIH 3T3 Golgi and MTOC polarity establishment. *J. Cell Sci.*, **116**, 743–756.
- Marin, O., Anderson, S.A. & Rubenstein, J.L. (2000) Origin and molecular specification of striatal interneurons. *J. Neurosci.*, **20**, 6063–6076.
- Marin, O., Plump, A.S., Flames, N., Sanchez-Camacho, C., Tessier-Lavigne, M. & Rubenstein, J.L. (2003) Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on subcortical *Slit1/2*-independent repulsion and cortical attraction. *Development*, **130**, 1889–1901.
- Marin, O. & Rubenstein, J.L. (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**, 780–790.

- Marin, O. & Rubenstein, J.L. (2003) Cell migration in the forebrain. *Annu. Rev. Neurosci.*, **26**, 441–483.
- Marin, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M. & Rubenstein, J.L. (2001) Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin–neuropilin interactions. *Science*, **293**, 872–875.
- McManus, M.F., Nasrallah, I.M., Pancoast, M.M., Wynshaw-Boris, A. & Golden, J.A. (2004) *Lis1* is necessary for normal non-radial migration of inhibitory interneurons. *Am. J. Pathol.*, **165**, 775–784.
- Metin, C. & Godement, P. (1996) The ganglionic eminence may be an intermediate target for corticofugal and thalamocortical axons. *J. Neurosci.*, **16**, 3219–3235.
- Miller, M.W. (1985) Cogeneration of retrogradely labeled corticocortical projection and GABA-immunoreactive local circuit neurons in cerebral cortex. *Brain Res.*, **355**, 187–192.
- Morante-Oria, J., Carleton, A., Ortino, B., Kremer, E.J., Fairen, A. & Lledo, P.M. (2003) Subpallial origin of a population of projecting pioneer neurons during corticogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 12468–12473.
- Moya, F. & Valdeolmillos, M. (2004) Polarized increase of calcium and nucleokinesis in tangentially migrating neurons. *Cereb. Cortex*, **14**, 610–618.
- Nadarajah, B., Alifragis, P., Wong, R.O. & Parnavelas, J.G. (2002) Ventricle-directed migration in the developing cerebral cortex. *Nat. Neurosci.*, **5**, 218–224.
- Nadarajah, B. & Parnavelas, J.G. (2002) Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.*, **3**, 423–432.
- Nery, S., Fishell, G. & Corbin, J.G. (2002) The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nat. Neurosci.*, **5**, 1279–1287.
- Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L. & Kriegstein, A.R. (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.*, **7**, 136–144.
- Palazzo, A.F., Joseph, H.L., Chen, Y.J., Dujardin, D.L., Alberts, A.S., Pfister, K.K., Vallee, R.B. & Gundersen, G.G. (2001) Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Curr. Biol.*, **11**, 1536–1541.
- Parnavelas, J.G. (2000) The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Trends Neurosci.*, **23**, 126–131.
- Parnavelas, J.G., Dinopoulos, A. & Davies, S.W. (1989) The central visual pathways. In Björklund, A., Hökfelt, T. & Swanson, L.W. (eds), *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Elsevier, Amsterdam, pp. 1–164.
- Peduzzi, J.D. (1988) Genesis of GABA-immunoreactive neurons in the ferret visual cortex. *J. Neurosci.*, **8**, 920–931.
- Piel, M., Meyer, P., Khodjakov, A., Rieder, C.L. & Bornens, M. (2000) The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *J. Cell Biol.*, **149**, 317–330.
- Pleasure, S.J., Anderson, S., Hevner, R., Bagri, A., Marin, O., Lowenstein, D.H. & Rubenstein, J.L. (2000) Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons. *Neuron*, **28**, 727–740.
- Polleux, F., Whitford, K.L., Dijkhuizen, P.A., Vitalis, T. & Ghosh, A. (2002) Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development*, **129**, 3147–3160.
- Powell, E.M., Mars, W.M. & Levitt, P. (2001) Hepatocyte growth factor/scatter factor is a motogen for interneurons migrating from the ventral to dorsal telencephalon. *Neuron*, **30**, 79–89.
- Pozas, E. & Ibanez, C.F. (2005) GDNF and GFRA1 promote differentiation and tangential migration of cortical GABAergic neurons. *Neuron*, **45**, 701–713.
- Prigozhina, N.L. & Waterman-Storer, C.M. (2004) Protein kinase D-mediated anterograde membrane trafficking is required for fibroblast motility. *Curr. Biol.*, **14**, 88–98.
- Rakic, P. (1972) Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.*, **145**, 61–83.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T. & Horwitz, A.R. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, **302**, 1704–1709.
- Rios, R.M. & Bornens, M. (2003) The Golgi apparatus at the cell centre. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**, 60–66.
- Rios, R.M., Sanchis, A., Tassin, A.M., Fedriani, C. & Bornens, M. (2004) GMAP-210 recruits gamma-tubulin complexes to cis-Golgi membranes and is required for Golgi ribbon formation. *Cell*, **118**, 323–335.
- Rivas, R.J. & Hatten, M.E. (1995) Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.*, **15**, 981–989.
- Sanchez-Madrid, F. & del Pozo, M.A. (1999) Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.*, **18**, 501–511.
- Schaar, B.T. & McConnell, S.K. (2005) Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 13652–13657.
- Schliwa, M., Pryzwansky, K.B. & Euteneuer, U. (1982) Centrosome splitting in neutrophils: an unusual phenomenon related to cell activation and motility. *Cell*, **31**, 705–717.
- Schmoranzner, J., Kreitzer, G. & Simon, S.M. (2003) Migrating fibroblasts perform polarized, microtubule-dependent exocytosis towards the leading edge. *J. Cell Sci.*, **116**, 4513–4519.
- Solecki, D.J., Model, L., Gaetz, J., Kapoor, T.M. & Hatten, M.E. (2004) Par6alpha signaling controls glial-guided neuronal migration. *Nat. Neurosci.*, **7**, 1195–1203.
- Straight, A.F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N.J., Sellers, J.R. & Mitchison, T.J. (2003) Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor. *Science*, **299**, 1743–1747.
- Tamamaki, N., Fujimori, K.E. & Takaiji, R. (1997) Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J. Neurosci.*, **17**, 8313–8323.
- Tanaka, D., Nakaya, Y., Yanagawa, Y., Obata, K. & Murakami, F. (2003) Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins. *Development*, **130**, 5803–5813.
- Tanaka, T., Serneo, F.F., Higgins, C., Gambello, M.J., Wynshaw-Boris, A. & Gleeson, J.G. (2004) *Lis1* and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *J. Cell Biol.*, **165**, 709–721.
- Ueda, M., Graf, R., MacWilliams, H.K., Schliwa, M. & Euteneuer, U. (1997) Centrosome positioning and directionality of cell movements. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 9674–9678.
- Valcanis, H. & Tan, S.S. (2003) Layer specification of transplanted interneurons in developing mouse neocortex. *J. Neurosci.*, **23**, 5113–5122.
- Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J.M., Herrera, D.G. & Alvarez-Buylla, A. (1999) Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. *Nat. Neurosci.*, **2**, 461–466.
- Wichterle, H., Turnbull, D.H., Nery, S., Fishell, G. & Alvarez-Buylla, A. (2001) In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development*, **128**, 3759–3771.
- Xie, Z., Sanada, K., Samuels, B.A., Shih, H. & Tsai, L.H. (2003) Serine 732 phosphorylation of FAK by Cdk5 is important for microtubule organization, nuclear movement, and neuronal migration. *Cell*, **114**, 469–482.
- Xu, Q., Cobos, I., De La Cruz, E., Rubenstein, J.L. & Anderson, S.A. (2004) Origins of cortical interneuron subtypes. *J. Neurosci.*, **24**, 2612–2622.
- Yau, H.J., Wang, H.F., Lai, C. & Liu, F.C. (2003) Neural development of the neuregulin receptor ErbB4 in the cerebral cortex and the hippocampus: preferential expression by interneurons tangentially migrating from the ganglionic eminences. *Cereb. Cortex*, **13**, 252–264.
- Yozu, M., Tabata, H. & Nakajima, K. (2004) Birth-date dependent alignment of GABAergic neurons occurs in a different pattern from that of non-GABAergic neurons in the developing mouse visual cortex. *Neurosci. Res.*, **49**, 395–403.
- Yozu, M., Tabata, H. & Nakajima, K. (2005) The caudal migratory stream: a novel migratory stream of interneurons derived from the caudal ganglionic eminence in the developing mouse forebrain. *J. Neurosci.*, **25**, 7268–7277.
- Zhao, Y., Marin, O., Hermesz, E., Powell, A., Flames, N., Palkovits, M., Rubenstein, J.L. & Westphal, H. (2003) The LIM-homeobox gene *Lhx8* is required for the development of many cholinergic neurons in the mouse forebrain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 9005–9010.

## ***BIBLIOGRAPHIE***



- Abraham, H., and Meyer, G.** (2003). Reelin-expressing neurons in the postnatal and adult human hippocampal formation. *Hippocampus* **13**, 715-727.
- Abraham, H., Perez-Garcia, C.G., and Meyer, G.** (2004). p73 and Reelin in Cajal-Retzius cells of the developing human hippocampal formation. *Cereb Cortex* **14**, 484-495.
- Aicardi, J.** (1991). The agyria-pachygyria complex: a spectrum of cortical malformations. *Brain Dev* **13**, 1-8.
- Albertson, R., and Doe, C.Q.** (2003). Dlg, Scrib and Lgl regulate neuroblast cell size and mitotic spindle asymmetry. *Nat Cell Biol* **5**, 166-170.
- Alblas, J., Ulfman, L., Hordijk, P., and Koenderman, L.** (2001). Activation of RhoA and ROCK are essential for detachment of migrating leukocytes. *Mol Biol Cell* **12**, 2137-2145.
- Albrecht-Buehler, G.** (1977). Phagokinetic tracks of 3T3 cells: parallels between the orientation of track segments and of cellular structures which contain actin or tubulin. *Cell* **12**, 333-339.
- Allen, K.M., Gleeson, J.G., Bagrodia, S., Partington, M.W., MacMillan, J.C., Cerione, R.A., Mulley, J.C., and Walsh, C.A.** (1998). PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Nat Genet* **20**, 25-30.
- Altman, J., and Bayer, S.A.** (1990). Vertical compartmentation and cellular transformations in the germinal matrices of the embryonic rat cerebral cortex. *Exp Neurol* **107**, 23-35.
- Anderson, R.G.** (1972). The three-dimensional structure of the basal body from the rhesus monkey oviduct. *J Cell Biol* **54**, 246-265.
- Anderson, S.A., Eisenstat, D.D., Shi, L., and Rubenstein, J.L.** (1997). Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* **278**, 474-476.
- Anderson, S.A., Marin, O., Horn, C., Jennings, K., and Rubenstein, J.L.** (2001). Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* **128**, 353-363.
- Anderson, S.A., Qiu, M., Bulfone, A., Eisenstat, D.D., Meneses, J., Pedersen, R., and Rubenstein, J.L.** (1997). Mutations of the homeobox genes *Dlx-1* and *Dlx-2* disrupt the striatal subventricular zone and differentiation of late born striatal neurons. *Neuron* **19**, 27-37.
- Andersson, C., Tytell, M., and Brunso-Bechtold, J.** (1993). Transplantation of cultured type 1 astrocyte cell suspensions into young, adult and aged rat cortex: cell migration and survival. *Int. J. Dev. Neurosci.* **11**, 555-568.
- Andrews, W.D., Barber, M., and Parnavelas, J.G.** (2007). Slit-Robo interactions during cortical development. *J Anat* **211**, 188-198.
- Andrews, W., Liapi, A., Plachez, C., Camurri, L., Zhang, J., Mori, S., Murakami, F., Parnavelas, J.G., Sundaresan, V., and Richards, L.J.** (2006). *Robo1* regulates the development of major axon tracts and interneuron migration in the forebrain. *Development* **133**, 2243-2252.
- Andrews, W., Barber, M., Hernandez-Miranda, L.R., Xian, J., Rakic, S., Sundaresan, V., Rabbitts, T.H., Pannell, R., Rabbitts, P., Thompson, H., Erskine, L., Murakami, F., and Parnavelas, J.G.** (2008). The role of Slit-Robo signaling in the generation, migration and morphological differentiation of cortical interneurons. *Dev Biol* **313**, 648-658.
- Ang, E.S., Jr., Haydar, T.F., Gluncic, V., and Rakic, P.** (2003). Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. *J Neurosci* **23**, 5805-5815.
- Angevine, J.B., Jr., and Sidman, R.L.** (1961). Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* **192**, 766-768.
- Aniento, F., Emans, N., Griffiths, G., and Gruenberg, J.** (1993). Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J Cell Biol* **123**, 1373-1387.
- Anton, E.S., Marchionni, M.A., Lee, K.F., and Rakic, P.** (1997). Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. *Development* **124**, 3501-3510.
- Arnaud, L., Ballif, B.A., Forster, E., and Cooper, J.A.** (2003). Fyn tyrosine kinase is a critical regulator of disabled-1 during brain development. *Curr Biol* **13**, 9-17.
- Arthur, W.T., and Burridge, K.** (2001). RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. *Mol Biol Cell* **12**, 2711-2720.
- Asada, N., Sanada, K., and Fukada, Y.** (2007). LKB1 regulates neuronal migration and neuronal differentiation in the developing neocortex through centrosomal positioning. *J Neurosci* **27**, 11769-11775.
- Assadi, A.H., Zhang, G., Beffert, U., McNeil, R.S., Renfro, A.L., Niu, S., Quattrocchi, C.C., Antalfy, B.A., Sheldon, M., Armstrong, D.D., Wynshaw-Boris, A., Herz, J., D'Arcangelo, G., and Clark, G.D.** (2003). Interaction of reelin signaling and *Lis1* in brain development. *Nat Genet* **35**, 270-276.
- Baes, M., Gressens, P., Baumgart, E., Carmeliet, P., Casteels, M., Franssen, M., Evrard, P., Fahimi, D., Declercq, P.E., Collen, D., van Veldhoven, P.P., and Mannaerts, G.P.** (1997). A mouse model for Zellweger syndrome. *Nat Genet* **17**, 49-57.
- Bai, C.B., Stephen, D., and Joyner, A.L.** (2004). All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of *Gli3*. *Dev Cell* **6**, 103-115.

- Bai, J., Ramos, R.L., Ackman, J.B., Thomas, A.M., Lee, R.V., and LoTurco, J.J.** (2003). RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat Neurosci* **6**, 1277-1283.
- Bai, J., Ramos, R.L., Paramasivam, M., Siddiqi, F., Ackman, J.B., and LoTurco, J.J.** (2008). The role of DCX and LIS1 in migration through the lateral cortical stream of developing forebrain. *Dev Neurosci* **30**, 144-156.
- Baird, D.H., Myers, K.A., Mogensen, M., Moss, D., and Baas, P.W.** (2004). Distribution of the microtubule-related protein ninein in developing neurons. *Neuropharmacology* **47**, 677-683.
- Balenci, L., Saoudi, Y., Grunwald, D., Deloulme, J.C., Bouron, A., Bernards, A., and Baudier, J.** (2007). IQGAP1 regulates adult neural progenitors in vivo and vascular endothelial growth factor-triggered neural progenitor migration in vitro. *J Neurosci* **27**, 4716-4724.
- Ballif, B.A., Arnaud, L., Arthur, W.T., Guris, D., Imamoto, A., and Cooper, J.A.** (2004). Activation of a Dab1/CrkL/C3G/Rap1 pathway in Reelin-stimulated neurons. *Curr Biol* **14**, 606-610.
- Bao, J., Jana, S.S., and Adelstein, R.S.** (2005). Vertebrate nonmuscle myosin II isoforms rescue small interfering RNA-induced defects in COS-7 cell cytokinesis. *J Biol Chem* **280**, 19594-19599.
- Baron, A.T., and Salisbury, J.L.** (1988). Identification and localization of a novel, cytoskeletal, centrosome-associated protein in PtK2 cells. *J Cell Biol* **107**, 2669-2678.
- Basto, R., Lau, J., Vinogradova, T., Gardiol, A., Woods, C.G., Khodjakov, A., and Raff, J.W.** (2006). Flies without centrioles. *Cell* **125**, 1375-1386.
- Bayer, V.E., and Pickel, V.M.** (1990). Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase in the rat ventral tegmental area: relationship between immunolabeling density and neuronal associations. *J Neurosci* **10**, 2996-3013.
- Bayer, S.A., Altman, J., Russo, R.J., Dai, X.F., and Simmons, J.A.** (1991). Cell migration in the rat embryonic neocortex. *J Comp Neurol* **307**, 499-516.
- Bellanger, J.M., Astier, C., Sardet, C., Ohta, Y., Stossel, T.P., and Debant, A.** (2000). The Rac1- and RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *Nat Cell Biol* **2**, 888-892.
- Bellion, A., and Metin, C.** (2005). Early regionalisation of the neocortex and the medial ganglionic eminence. *Brain Res Bull* **66**, 402-409.
- Bellion, A., Baudoin, J.P., Alvarez, C., Bornens, M., and Metin, C.** (2005). Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J Neurosci* **25**, 5691-5699.
- Bentivoglio, M., and Mazzarello, P.** (1999). The history of radial glia. *Brain Res Bull* **49**, 305-315.
- Bentivoglio, M., and Mazzarello, P.** (1999). The history of radial glia. *Brain Res Bull* **49**, 305-315.
- Berberi, N.F., Bishop, G.A., Askwith, C.C., Lewis, J.S., and Mykytyn, K.** (2007). Hippocampal neurons possess primary cilia in culture. *J Neurosci Res* **85**, 1095-1100.
- Berghuis, P., Dobszay, M.B., Wang, X., Spano, S., Ledda, F., Sousa, K.M., Schulte, G., Ernfor, P., Mackie, K., Paratcha, G., Hurd, Y.L., and Harkany, T.** (2005). Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 19115-19120.
- Bergmann, J.E., Kupfer, A., and Singer, S.J.** (1983). Membrane insertion at the leading edge of motile fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 1367-1371.
- Bernards, A.** (2003). GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila*. *Biochim Biophys Acta* **1603**, 47-82.
- Berry, M., and Rogers, A.W.** (1965). The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex. *J. Anat.* **99**, 691-709.
- Betz, R.C., Planko, L., Eigelshoven, S., Hanneken, S., Pasternack, S.M., Bussow, H., Van Den Bogaert, K., Wenzel, J., Braun-Falco, M., Rutten, A., Rogers, M.A., Ruzicka, T., Nothen, M.M., Magin, T.M., and Kruse, R.** (2006). Loss-of-function mutations in the keratin 5 gene lead to Dowling-Degos disease. *Am J Hum Genet* **78**, 510-519.
- Bielle, F., Griveau, A., Narboux-Neme, N., Vigneau, S., Sigrist, M., Arber, S., Wassef, M., and Pierani, A.** (2005). Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat Neurosci* **8**, 1002-1012.
- Bijlsma, M.F., Borenszajn, K.S., Roelink, H., Peppelenbosch, M.P., and Spek, C.A.** (2007). Sonic hedgehog induces transcription-independent cytoskeletal rearrangement and migration regulated by arachidonate metabolites. *Cell Signal* **19**, 2596-2604.
- Bishop, A.L., and Hall, A.** (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348 Pt 2**, 241-255.
- Bishop, A.L., and Hall, A.** (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348 Pt 2**, 241-255.
- Bix, G.J., and Clark, G.D.** (1998). Platelet-activating factor receptor stimulation disrupts neuronal migration In vitro. *J Neurosci* **18**, 307-318.
- Blom, H.J., Shaw, G.M., den Heijer, M., and Finnell, R.H.** (2006). Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci* **7**, 724-731.

- Bobiniec, Y., Moudjou, M., Fouquet, J.P., Desbruyeres, E., Edde, B., and Bornens, M.** (1998). Glutamylolation of centriole and cytoplasmic tubulin in proliferating non-neuronal cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **39**, 223-232.
- Bobiniec, Y., Khodjakov, A., Mir, L.M., Rieder, C.L., Edde, B., and Bornens, M.** (1998). Centriole disassembly in vivo and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells. *J Cell Biol* **143**, 1575-1589.
- Bock, H.H., Jossin, Y., Liu, P., Forster, E., May, P., Goffinet, A.M., and Herz, J.** (2003). Phosphatidylinositol 3-kinase interacts with the adaptor protein Dab1 in response to Reelin signaling and is required for normal cortical lamination. *J Biol Chem* **278**, 38772-38779.
- Boisvieux-Ulrich, E., Laine, M.C., and Sandoz, D.** (1989). In vitro effects of colchicine and nocodazole on ciliogenesis in quail oviduct. *Biol Cell* **67**, 67-79.
- Boisvieux-Ulrich, E., Laine, M.C., and Sandoz, D.** (1990). Cytochalasin D inhibits basal body migration and ciliary elongation in quail oviduct epithelium. *Cell Tissue Res* **259**, 443-454.
- Bokoch, G.M.** (2003). Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem* **72**, 743-781.
- Boncinelli, E., Mallamaci, A., and Muzio, L.** (2000). Genetic control of regional identity in the developing vertebrate forebrain. *Novartis Found Symp* **228**, 53-61; discussion 61-56, 109-113.
- Bonnet, C., Boucher, D., Lazereg, S., Pedrotti, B., Islam, K., Denoulet, P., and Larcher, J.C.** (2001). Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylolation. *J Biol Chem* **276**, 12839-12848.
- Bosgraaf, L., and van Haastert, P.J.** (2006). The regulation of myosin II in Dictyostelium. *Eur J Cell Biol* **85**, 969-979.
- Bossinger, O., and Bachmann, A.** (2004). Ciliogenesis: polarity proteins on the move. *Curr Biol* **14**, R844-846.
- Boveri, T.** (1888). *Zellen-Studien II. Die Befruchtung und Teilung des Eies von Ascaris megaloccephala*. G. Fischer, Jena 198 pp.
- Brailov, I., Bancila, M., Brisorgueil, M.J., Miquel, M.C., Hamon, M., and Verge, D.** (2000). Localization of 5-HT(6) receptors at the plasma membrane of neuronal cilia in the rat brain. *Brain Res* **872**, 271-275.
- Bresnick, A.R.** (1999). Molecular mechanisms of nonmuscle myosin-II regulation. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 26-33.
- Briggs, M.W., and Sacks, D.B.** (2003). IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Rep* **4**, 571-574.
- Briscoe, J., Chen, Y., Jessell, T.M., and Struhl, G.** (2001). A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol Cell* **7**, 1279-1291.
- Brodsky, I.B., Burakov, A.V., and Nadezhdina, E.S.** (2007). Microtubules' interaction with cell cortex is required for their radial organization, but not for centrosome positioning. *Cell Motil Cytoskeleton* **64**, 407-417.
- Brody, S.L., Yan, X.H., Wuerffel, M.K., Song, S.K., and Shapiro, S.D.** (2000). Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4-null mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **23**, 45-51.
- Bukanov, N.O., Smith, L.A., Klinger, K.W., Ledbetter, S.R., and Ibraghimov-Beskrovnaya, O.** (2006). Long-lasting arrest of murine polycystic kidney disease with CDK inhibitor roscovitine. *Nature* **444**, 949-952.
- Bulfone, A., Wang, F., Hevner, R., Anderson, S., Cutforth, T., Chen, S., Meneses, J., Pedersen, R., Axel, R., and Rubenstein, J.L.** (1998). An olfactory sensory map develops in the absence of normal projection neurons or GABAergic interneurons. *Neuron* **21**, 1273-1282.
- Buonanno, A., and Fischbach, G.D.** (2001). Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 287-296.
- Burakov, A., Nadezhdina, E., Slepchenko, B., and Rodionov, V.** (2003). Centrosome positioning in interphase cells. *J Cell Biol* **162**, 963-969.
- Burkhardt, J.K., Echeverri, C.J., Nilsson, T., and Vallee, R.B.** (1997). Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J Cell Biol* **139**, 469-484.
- Butt, S.J., Fuccillo, M., Nery, S., Noctor, S., Kriegstein, A., Corbin, J.G., and Fishell, G.** (2005). The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron* **48**, 591-604.
- Bystron, I., Rakic, P., Molnar, Z., and Blakemore, C.** (2006). The first neurons of the human cerebral cortex. *Nat Neurosci* **9**, 880-886.
- Cahana, A., Escamez, T., Nowakowski, R.S., Hayes, N.L., Giacobini, M., von Holst, A., Shmueli, O., Sapir, T., McConnell, S.K., Wurst, W., Martinez, S., and Reiner, O.** (2001). Targeted mutagenesis of Lis1 disrupts cortical development and LIS1 homodimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6429-6434.
- Cai, Y., Biais, N., Giannone, G., Tanase, M., Jiang, G., Hofman, J.M., Wiggins, C.H., Silberzan, P., Buguin, A., Ladoux, B., and Sheetz, M.P.** (2006). Nonmuscle myosin IIA-dependent force inhibits cell spreading and drives F-actin flow. *Biophys J* **91**, 3907-3920.
- Cajal, R.y.** (1911). *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. traduction L. Azoulay - Maloine, Paris.

- Cajal, R.y.** (1923). Recuerdos de mi vida: Historia de mi labor científica.
- Camera, P., da Silva, J.S., Griffiths, G., Giuffrida, M.G., Ferrara, L., Schubert, V., Imarisio, S., Silengo, L., Dotti, C.G., and Di Cunto, F.** (2003). Citron-N is a neuronal Rho-associated protein involved in Golgi organization through actin cytoskeleton regulation. *Nat Cell Biol* **5**, 1071-1078.
- Campbell, K.** (2003). Dorsal-ventral patterning in the mammalian telencephalon. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 50-56.
- Caron, J.M.** (1997). Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: I. In vivo and cell-free studies. *Mol Biol Cell* **8**, 621-636.
- Caron, J.M., Vega, L.R., Fleming, J., Bishop, R., and Solomon, F.** (2001). Single site alpha-tubulin mutation affects astral microtubules and nuclear positioning during anaphase in *Saccharomyces cerevisiae*: possible role for palmitoylation of alpha-tubulin. *Mol Biol Cell* **12**, 2672-2687.
- Casarosa, S., Fode, C., and Guillemot, F.** (1999). Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* **126**, 525-534.
- Caspary, T., Larkins, C.E., and Anderson, K.V.** (2007). The graded response to Sonic Hedgehog depends on cilia architecture. *Dev Cell* **12**, 767-778.
- Caspi, M., Atlas, R., Kantor, A., Sapir, T., and Reiner, O.** (2000). Interaction between LIS1 and doublecortin, two lissencephaly gene products. *Hum Mol Genet* **9**, 2205-2213.
- Cau, J., and Hall, A.** (2005). Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signal transduction pathways. *J Cell Sci* **118**, 2579-2587.
- Cauli, B., Audinat, E., Lambolez, B., Angulo, M.C., Ropert, N., Tsuzuki, K., Hestrin, S., and Rossier, J.** (1997). Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J Neurosci* **17**, 3894-3906.
- Causeret, F., Hidalgo-Sanchez, M., Fort, P., Backer, S., Popoff, M.R., Gauthier-Rouviere, C., and Bloch-Gallego, E.** (2004). Distinct roles of Rac1/Cdc42 and Rho/Rock for axon outgrowth and nucleokinesis of precerebellar neurons toward netrin 1. *Development* **131**, 2841-2852.
- Cavanagh, M.E., and Parnavelas, J.G.** (1988). Development of somatostatin immunoreactive neurons in the rat occipital cortex: a combined immunocytochemical-autoradiographic study. *J Comp Neurol* **268**, 1-12.
- Caviness, V.S., Jr.** (1982). Development of neocortical afferent systems: studies in the reeler mouse. *Neurosci Res Program Bull* **20**, 560-569.
- Charron, F., Stein, E., Jeong, J., McMahon, A.P., and Tessier-Lavigne, M.** (2003). The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* **113**, 11-23.
- Chen, C.S., Tan, J., and Tien, J.** (2004). Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts. *Annu Rev Biomed Eng* **6**, 275-302.
- Chen, L., Liao, G., Waclaw, R.R., Burns, K.A., Linqvist, D., Campbell, K., Zheng, Y., and Kuan, C.Y.** (2007). Rac1 controls the formation of midline commissures and the competency of tangential migration in ventral telencephalic neurons. *J Neurosci* **27**, 3884-3893.
- Cheney, R.E., O'Shea, M.K., Heuser, J.E., Coelho, M.V., Wolenski, J.S., Espreafico, E.M., Forscher, P., Larson, R.E., and Mooseker, M.S.** (1993). Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell* **75**, 13-23.
- Chenn, A., and McConnell, S.K.** (1995). Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* **82**, 631-641.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., and Beachy, P.A.** (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407-413.
- Chizhikov, V.V., Davenport, J., Zhang, Q., Shih, E.K., Cabello, O.A., Fuchs, J.L., Yoder, B.K., and Millen, K.J.** (2007). Cilia proteins control cerebellar morphogenesis by promoting expansion of the granule progenitor pool. *J Neurosci* **27**, 9780-9789.
- Choi, Y., Borghesani, P.R., Chan, J.A., and Segal, R.A.** (2005). Migration from a mitogenic niche promotes cell-cycle exit. *J Neurosci* **25**, 10437-10445.
- Christensen, S.T., and Ott, C.M.** (2007). Cell signaling. A ciliary signaling switch. *Science* **317**, 330-331.
- Chuang, P.T., Kawcak, T., and McMahon, A.P.** (2003). Feedback control of mammalian Hedgehog signaling by the Hedgehog-binding protein, Hip1, modulates Fgf signaling during branching morphogenesis of the lung. *Genes Dev* **17**, 342-347.
- Cincinnati, P., Neri, M.E., and Valentini, A.** (2000). Dandy-Walker anomaly in Meckel-Gruber syndrome. *Clin Dysmorphol* **9**, 35-38.
- Cobos, I., Borello, U., and Rubenstein, J.L.** (2007). Dlx transcription factors promote migration through repression of axon and dendrite growth. *Neuron* **54**, 873-888.
- Cogswell, C.A., Sarkisian, M.R., Leung, V., Patel, R., D'Mello, S.R., and LoTurco, J.J.** (1998). A gene essential to brain growth and development maps to the distal arm of rat chromosome 12. *Neurosci Lett* **251**, 5-8.
- Collier, S., and Gubb, D.** (1997). *Drosophila* tissue polarity requires the cell-autonomous activity of the fuzzy gene, which encodes a novel transmembrane protein. *Development* **124**, 4029-4037.

- Conti, M.A., Even-Ram, S., Liu, C., Yamada, K.M., and Adelstein, R.S.** (2004). Defects in cell adhesion and the visceral endoderm following ablation of nonmuscle myosin heavy chain II-A in mice. *J Biol Chem* **279**, 41263-41266.
- Cooper, G.M.** (2000). *The Cell: a molecular approach*. Sinauer Editions. 2nd Edition.
- Cope, N., Harold, D., Hill, G., Moskvina, V., Stevenson, J., Holmans, P., Owen, M.J., O'Donovan, M.C., and Williams, J.** (2005). Strong evidence that KIAA0319 on chromosome 6p is a susceptibility gene for developmental dyslexia. *Am J Hum Genet* **76**, 581-591.
- Corbin, J.G., Nery, S., and Fishell, G.** (2001). Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain. *Nat Neurosci* **4 Suppl**, 1177-1182.
- Corbin, J.G., Rutlin, M., Gaiano, N., and Fishell, G.** (2003). Combinatorial function of the homeodomain proteins Nkx2.1 and Gsh2 in ventral telencephalic patterning. *Development* **130**, 4895-4906.
- Corbin, J.G., Gaiano, N., Machold, R.P., Langston, A., and Fishell, G.** (2000). The Gsh2 homeodomain gene controls multiple aspects of telencephalic development. *Development* **127**, 5007-5020.
- Corbo, J.C., Deuel, T.A., Long, J.M., LaPorte, P., Tsai, E., Wynshaw-Boris, A., and Walsh, C.A.** (2002). Doublecortin is required in mice for lamination of the hippocampus but not the neocortex. *J Neurosci* **22**, 7548-7557.
- Crandall, J.E., McCarthy, D.M., Araki, K.Y., Sims, J.R., Ren, J.Q., and Bhide, P.G.** (2007). Dopamine receptor activation modulates GABA neuron migration from the basal forebrain to the cerebral cortex. *J Neurosci* **27**, 3813-3822.
- Dahl, H.A.** (1963). Fine structure of cilia in rat cerebral cortex. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **60**, 369-386.
- D'Arcangelo, G., Miao, G.G., Chen, S.C., Soares, H.D., Morgan, J.I., and Curran, T.** (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* **374**, 719-723.
- Daub, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Sobel, A., and Hall, A.** (2001). Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. *J Biol Chem* **276**, 1677-1680.
- Dawe, H.R., Farr, H., and Gull, K.** (2007). Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. *J Cell Sci* **120**, 7-15.
- de Anda, F.C., Pollarolo, G., Da Silva, J.S., Camoletto, P.G., Feiguin, F., and Dotti, C.G.** (2005). Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature* **436**, 704-708.
- De Brabander, M.** (1982). A model for the microtubule organizing activity of the centrosomes and kinetochores in mammalian cells. *Cell Biol Int Rep* **6**, 901-915.
- De Brabander, M.J., Van de Veire, R.M., Aerts, F.E., Borgers, M., and Janssen, P.A.** (1976). The effects of methyl (5-(2-thienylcarbonyl)-1H-benzimidazol-2-yl) carbamate, (R 17934; NSC 238159), a new synthetic antitumoral drug interfering with microtubules, on mammalian cells cultured in vitro. *Cancer Res* **36**, 905-916.
- de Carlos, J.A., Lopez-Masaraque, L., and Valverde, F.** (1996). Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci* **16**, 6146-6156.
- DeDiego, I., Smith-Fernandez, A., and Fairen, A.** (1994). Cortical cells that migrate beyond area boundaries: characterization of an early neuronal population in the lower intermediate zone of prenatal rats. *Eur J Neurosci* **6**, 983-997.
- DeFelipe, J.** (1993). Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cereb Cortex* **3**, 273-289.
- Dehay, C., and Kennedy, H.** (2007). Cell-cycle control and cortical development. *Nat Rev Neurosci* **8**, 438-450.
- del Rio, J.A., Martinez, A., Fonseca, M., Auladell, C., and Soriano, E.** (1995). Glutamate-like immunoreactivity and fate of Cajal-Retzius cells in the murine cortex as identified with calretinin antibody. *Cereb Cortex* **5**, 13-21.
- Delattre, M., and Gonczy, P.** (2004). The arithmetic of centrosome biogenesis. *J Cell Sci* **117**, 1619-1630.
- Delgehr, N., Sillibourne, J., and Bornens, M.** (2005). Microtubule nucleation and anchoring at the centrosome are independent processes linked by ninein function. *J Cell Sci* **118**, 1565-1575.
- Denaxa, M., Chan, C.H., Schachner, M., Parnavelas, J.G., and Karageorgos, D.** (2001). The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development* **128**, 4635-4644.
- Denaxa, M., Kyriakopoulou, K., Theodorakis, K., Trichas, G., Vidaki, M., Takeda, Y., Watanabe, K., and Karageorgos, D.** (2005). The adhesion molecule TAG-1 is required for proper migration of the superficial migratory stream in the medulla but not of cortical interneurons. *Dev Biol* **288**, 87-99.
- Derer, P., and Derer, M.** (1990). Cajal-Retzius cell ontogenesis and death in mouse brain visualized with horseradish peroxidase and electron microscopy. *Neuroscience* **36**, 839-856.
- Derry, W.B., Wilson, L., and Jordan, M.A.** (1995). Substoichiometric binding of taxol suppresses microtubule dynamics. *Biochemistry* **34**, 2203-2211.



**des Portes, V., Pinard, J.M., Billuart, P., Vinet, M.C., Koulakoff, A., Carrie, A., Gelot, A., Dupuis, E., Motte, J., Berwald-Netter, Y., Catala, M., Kahn, A., Beldjord, C., and Chelly, J.** (1998). A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell* **92**, 51-61.

**des Portes, V., Francis, F., Pinard, J.M., Desguerre, I., Moutard, M.L., Snoeck, I., Meiners, L.C., Capron, F., Cusmai, R., Ricci, S., Motte, J., Echenne, B., Ponsot, G., Dulac, O., Chelly, J., and Beldjord, C.** (1998). doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH). *Hum Mol Genet* **7**, 1063-1070.

**Deshpande, G., Swanhart, L., Chiang, P., and Schedl, P.** (2001). Hedgehog signaling in germ cell migration. *Cell* **106**, 759-769.

**Dhamodharan, R., Jordan, M.A., Thrower, D., Wilson, L., and Wadsworth, P.** (1995). Vinblastine suppresses dynamics of individual microtubules in living interphase cells. *Mol Biol Cell* **6**, 1215-1229.

**Dobyns, W.B., Guerrini, R., Czapansky-Beilman, D.K., Pierpont, M.E., Breningstall, G., Yock, D.H., Jr., Bonanni, P., and Truwit, C.L.** (1997). Bilateral periventricular nodular heterotopia with mental retardation and syndactyly in boys: a new X-linked mental retardation syndrome. *Neurology* **49**, 1042-1047.

**Doetsch, F., and Alvarez-Buylla, A.** (1996). Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14895-14900.

**Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A.** (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97**, 703-716.

**Dubreuil, V., Marzesco, A.M., Corbeil, D., Huttner, W.B., and Wilsch-Brauninger, M.** (2007). Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1. *J Cell Biol* **176**, 483-495.

**Dujardin, D.L., and Vallee, R.B.** (2002). Dynein at the cortex. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 44-49.

**Dujardin, D.L., Barnhart, L.E., Stehman, S.A., Gomes, E.R., Gundersen, G.G., and Vallee, R.B.** (2003). A role for cytoplasmic dynein and LIS1 in directed cell movement. *J Cell Biol* **163**, 1205-1211.

**Dulabon, L., Olson, E.C., Taglienti, M.G., Eisenhuth, S., McGrath, B., Walsh, C.A., Kreidberg, J.A., and Anton, E.S.** (2000). Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* **27**, 33-44.

**Duncan, D.W., V. Morales, R.** (1963). Centrioles and cilia-like structures in spinal gray matter. *Tex Rep Biol Med* **21**, 185-187.

**Edde, B., Rossier, J., Le Caer, J.P., Desbruyeres, E., Gros, F., and Denoulet, P.** (1990). Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. *Science* **247**, 83-85.

**Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., and Kirschner, M.W.** (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* **418**, 790-793.

**Edmondson, J.C., and Hatten, M.E.** (1987). Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high-resolution time-lapse video microscopic study. *J Neurosci* **7**, 1928-1934.

**Edmunds, S.M., and Parnavelas, J.G.** (1982). Retzius-Cajal cells: an ultrastructural study in the developing visual cortex of the rat. *J Neurocytol* **11**, 427-446.

**Elias, L.A., Wang, D.D., and Kriegstein, A.R.** (2007). Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* **448**, 901-907.

**Erck, C., Peris, L., Andrieux, A., Meissirel, C., Gruber, A.D., Vernet, M., Schweitzer, A., Saoudi, Y., Pointu, H., Bosc, C., Salin, P.A., Job, D., and Wehland, J.** (2005). A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7853-7858.

**Eshel, D., Urrestarazu, L.A., Vissers, S., Jauniaux, J.C., van Vliet-Reedijk, J.C., Planta, R.J., and Gibbons, I.R.** (1993). Cytoplasmic dynein is required for normal nuclear segregation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11172-11176.

**Etienne-Manneville, S., and Hall, A.** (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* **106**, 489-498.

**Etienne-Manneville, S., and Hall, A.** (2003). Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* **421**, 753-756.

**Etienne-Manneville, S., Manneville, J.B., Nicholls, S., Ferenczi, M.A., and Hall, A.** (2005). Cdc42 and Par6-PKCzeta regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization. *J Cell Biol* **170**, 895-901.

**Euteneuer, U., and Schliwa, M.** (1992). Mechanism of centrosome positioning during the wound response in BSC-1 cells. *J Cell Biol* **116**, 1157-1166.

**Even-Ram, S., Doyle, A.D., Conti, M.A., Matsumoto, K., Adelstein, R.S., and Yamada, K.M.** (2007). Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin-microtubule crosstalk. *Nat Cell Biol* **9**, 299-309.

**Falconer, D.** (1951). 2 new mutants, trembler and reeler, with neurological actions in the house mouse (mus-musculus l). *J. Genet* **50**, 192-201.

**Falls, D.L.** (2003). Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* **284**, 14-30.

- Fan, S., Hurd, T.W., Liu, C.J., Straight, S.W., Weimbs, T., Hurd, E.A., Domino, S.E., and Margolis, B.** (2004). Polarity proteins control ciliogenesis via kinesin motor interactions. *Curr Biol* **14**, 1451-1461.
- Farkasovsky, M., and Kuntzel, H.** (2001). Cortical Num1p interacts with the dynein intermediate chain Pac11p and cytoplasmic microtubules in budding yeast. *J Cell Biol* **152**, 251-262.
- Faulkner, N.E., Dujardin, D.L., Tai, C.Y., Vaughan, K.T., O'Connell, C.B., Wang, Y., and Vallee, R.B.** (2000). A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat Cell Biol* **2**, 784-791.
- Feng, Y., and Walsh, C.A.** (2001). Protein-protein interactions, cytoskeletal regulation and neuronal migration. *Nat Rev Neurosci* **2**, 408-416.
- Feng, Y., and Walsh, C.A.** (2004). Mitotic spindle regulation by Nde1 controls cerebral cortical size. *Neuron* **44**, 279-293.
- Ferrante, M.I., Giorgio, G., Feather, S.A., Bulfone, A., Wright, V., Ghiani, M., Selicorni, A., Gammaro, L., Scolari, F., Woolf, A.S., Sylvie, O., Bernard, L., Malcolm, S., Winter, R., Ballabio, A., and Franco, B.** (2001). Identification of the gene for oral-facial-digital type I syndrome. *Am J Hum Genet* **68**, 569-576.
- Fishell, G., and Kriegstein, A.R.** (2003). Neurons from radial glia: the consequences of asymmetric inheritance. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 34-41.
- Fizman, M.L., Behar, T., Lange, G.D., Smith, S.V., Novotny, E.A., and Barker, J.L.** (1993). GABAergic cells and signals appear together in the early post-mitotic period of telencephalic and striatal development. *Brain Res Dev Brain Res* **73**, 243-251.
- Flames, N., Pla, R., Gelman, D.M., Rubenstein, J.L., Puellas, L., and Marin, O.** (2007). Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes. *J Neurosci* **27**, 9682-9695.
- Flames, N., Long, J.E., Garratt, A.N., Fischer, T.M., Gassmann, M., Birchmeier, C., Lai, C., Rubenstein, J.L., and Marin, O.** (2004). Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* **44**, 251-261.
- Flemming, W.** (1875). Studien über die Entwicklungsgeschichte des Najaden., 81-147.
- Fliegauf, M., Benzing, T., and Omran, H.** (2007). When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 880-893.
- Fode, C., Ma, Q., Casarosa, S., Ang, S.L., Anderson, D.J., and Guillemot, F.** (2000). A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev* **14**, 67-80.
- Fourest-Lieuvin, A., Peris, L., Gache, V., Garcia-Saez, I., Juillan-Binard, C., Lantéz, V., and Job, D.** (2006). Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Mol Biol Cell* **17**, 1041-1050.
- Fox, J.W., Lamperti, E.D., Eksioğlu, Y.Z., Hong, S.E., Feng, Y., Graham, D.A., Scheffer, I.E., Dobyns, W.B., Hirsch, B.A., Radtke, R.A., Berkovic, S.F., Huttenlocher, P.R., and Walsh, C.A.** (1998). Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* **21**, 1315-1325.
- Francis, F., Meyer, G., Fallet-Bianco, C., Moreno, S., Kappeler, C., Socorro, A.C., Tuy, F.P., Beldjord, C., and Chelly, J.** (2006). Human disorders of cortical development: from past to present. *Eur J Neurosci* **23**, 877-893.
- Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M.C., Friocourt, G., McDonnell, N., Reiner, O., Kahn, A., McConnell, S.K., Berwald-Netter, Y., Denoulet, P., and Chelly, J.** (1999). Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* **23**, 247-256.
- Francks, C., Paracchini, S., Smith, S.D., Richardson, A.J., Scerri, T.S., Cardon, L.R., Marlow, A.J., MacPhie, I.L., Walter, J., Pennington, B.F., Fisher, S.E., Olson, R.K., DeFries, J.C., Stein, J.F., and Monaco, A.P.** (2004). A 77-kilobase region of chromosome 6p22.2 is associated with dyslexia in families from the United Kingdom and from the United States. *Am J Hum Genet* **75**, 1046-1058.
- Friocourt, G., Liu, J.S., Antypa, M., Rakic, S., Walsh, C.A., and Parnavelas, J.G.** (2007). Both doublecortin and doublecortin-like kinase play a role in cortical interneuron migration. *J Neurosci* **27**, 3875-3883.
- Friocourt, G., Koulakoff, A., Chafey, P., Boucher, D., Fauchereau, F., Chelly, J., and Francis, F.** (2003). Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. *Cereb Cortex* **13**, 620-626.
- Friocourt, G., Chafey, P., Billuart, P., Koulakoff, A., Vinet, M.C., Schaar, B.T., McConnell, S.K., Francis, F., and Chelly, J.** (2001). Doublecortin interacts with mu subunits of clathrin adaptor complexes in the developing nervous system. *Mol Cell Neurosci* **18**, 307-319.
- Friocourt, G., Kappeler, C., Saillour, Y., Fauchereau, F., Rodriguez, M.S., Bahi, N., Vinet, M.C., Chafey, P., Poirier, K., Taya, S., Wood, S.A., Dargemont, C., Francis, F., and Chelly, J.** (2005). Doublecortin interacts with the ubiquitin protease DFFRX, which associates with microtubules in neuronal processes. *Mol Cell Neurosci* **28**, 153-164.
- Fuchs, J.L., and Schwark, H.D.** (2004). Neuronal primary cilia: a review. *Cell Biol Int* **28**, 111-118.

**Fuchs, J.L., and Schwark, H.D.** (2004). Neuronal primary cilia: a review. *Cell Biol Int* **28**, 111-118.

**Fukata, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Iwamatsu, A., Perez, F., and Kaibuchi, K.** (2002). Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell* **109**, 873-885.

**Fukushima, N., Weiner, J.A., Kaushal, D., Contos, J.J., Rehen, S.K., Kingsbury, M.A., Kim, K.Y., and Chun, J.** (2002). Lysophosphatidic acid influences the morphology and motility of young, postmitotic cortical neurons. *Mol Cell Neurosci* **20**, 271-282.

**Gadisseux, J.F., Kadhim, H.J., van den Bosch de Aguilar, P., Caviness, V.S., and Evrard, P.** (1990). Neuron migration within the radial glial fiber system of the developing murine cerebrum: an electron microscopic autoradiographic analysis. *Brain Res Dev Brain Res* **52**, 39-56.

**Gagnon, C., White, D., Cosson, J., Huitorel, P., Edde, B., Desbruyeres, E., Paturle-Lafanechere, L., Multigner, L., Job, D., and Cibert, C.** (1996). The polyglutamylated lateral chain of alpha-tubulin plays a key role in flagellar motility. *J Cell Sci* **109** ( Pt 6), 1545-1553.

**Galaburda, A.M., Sherman, G.F., Rosen, G.D., Aboitiz, F., and Geschwind, N.** (1985). Developmental dyslexia: four consecutive patients with cortical anomalies. *Ann Neurol* **18**, 222-233.

**Galjart, N., and Perez, F.** (2003). A plus-end raft to control microtubule dynamics and function. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 48-53.

**Gambello, M.J., Darling, D.L., Yingling, J., Tanaka, T., Gleeson, J.G., and Wynshaw-Boris, A.** (2003). Multiple dose-dependent effects of Lis1 on cerebral cortical development. *J Neurosci* **23**, 1719-1729.

**Garcia, A.D., Doan, N.B., Imura, T., Bush, T.G., and Sofroniew, M.V.** (2004). GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* **7**, 1233-1241.

**Gard, D.L., and Kirschner, M.W.** (1985). A polymer-dependent increase in phosphorylation of beta-tubulin accompanies differentiation of a mouse neuroblastoma cell line. *J Cell Biol* **100**, 764-774.

**Gibbons, I.** (1965). Chemical dissection of cilia. *Arch Biol (Liege)* **76**, 317-352.

**Gibbons, B.H., and Gibbons, I.R.** (1987). Vanadate-sensitized cleavage of dynein heavy chains by 365-nm irradiation of demembrated sperm flagella and its effect on the flagellar motility. *J Biol Chem* **262**, 8354-8359.

**Gilmore, E.C., and Herrup, K.** (2001). Neocortical cell migration: GABAergic neurons and cells in layers I and VI move in a cyclin-dependent kinase 5-independent manner. *J Neurosci* **21**, 9690-9700.

**Gilmore, E.C., Ohshima, T., Goffinet, A.M., Kulkarni, A.B., and Herrup, K.** (1998). Cyclin-dependent kinase 5-deficient mice demonstrate novel developmental arrest in cerebral cortex. *J Neurosci* **18**, 6370-6377.

**Gleeson, J.G., Lin, P.T., Flanagan, L.A., and Walsh, C.A.** (1999). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* **23**, 257-271.

**Gleeson, J.G., Allen, K.M., Fox, J.W., Lamperti, E.D., Berkovic, S., Scheffer, I., Cooper, E.C., Dobyns, W.B., Minnerath, S.R., Ross, M.E., and Walsh, C.A.** (1998). Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* **92**, 63-72.

**Glotzer, M.** (2005). The molecular requirements for cytokinesis. *Science* **307**, 1735-1739.

**Goldman, A.E., Moir, R.D., Montag-Lowy, M., Stewart, M., and Goldman, R.D.** (1992). Pathway of incorporation of microinjected lamin A into the nuclear envelope. *J Cell Biol* **119**, 725-735.

**Goldman, R.D., Khuon, S., Chou, Y.H., Opal, P., and Steinert, P.M.** (1996). The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J Cell Biol* **134**, 971-983.

**Golgi, G.** (1873). Sulla struttura della sostanza grigia del cervello. *Gazzetta Medica Italiana: Lombardia* **33**, 244-246.

**Golomb, E., Ma, X., Jana, S.S., Preston, Y.A., Kawamoto, S., Shoham, N.G., Goldin, E., Conti, M.A., Sellers, J.R., and Adelstein, R.S.** (2004). Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *J Biol Chem* **279**, 2800-2808.

**Gomes, E.R., Jani, S., and Gundersen, G.G.** (2005). Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell* **121**, 451-463.

**Gomperts, B.N., Gong-Cooper, X., and Hackett, B.P.** (2004). Foxj1 regulates basal body anchoring to the cytoskeleton of ciliated pulmonary epithelial cells. *J Cell Sci* **117**, 1329-1337.

**Gonchar, Y., and Burkhalter, A.** (1997). Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cereb Cortex* **7**, 347-358.

**Gonzalez-Billault, C., Jimenez-Mateos, E.M., Caceres, A., Diaz-Nido, J., Wandosell, F., and Avila, J.** (2004). Microtubule-associated protein 1B function during normal development, regeneration, and pathological conditions in the nervous system. *J Neurobiol* **58**, 48-59.

**Gonzalez-Billault, C., Del Rio, J.A., Urena, J.M., Jimenez-Mateos, E.M., Barallobre, M.J., Pascual, M., Pujadas, L., Simo, S., Torre, A.L., Gavin, R., Wandosell, F., Soriano, E., and Avila, J.** (2005). A role of MAP1B in Reelin-dependent neuronal migration. *Cereb Cortex* **15**, 1134-1145.

**Goodrich, L.V., Milenkovic, L., Higgins, K.M., and Scott, M.P.** (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* **277**, 1109-1113.

- Gorgidze, L.A., and Vorobjev, I.A.** (1995). Centrosome and microtubules behavior in the cytoplasts. *J Submicrosc Cytol Pathol* **27**, 381-389.
- Gorski, J.A., Talley, T., Qiu, M., Puelles, L., Rubenstein, J.L., and Jones, K.R.** (2002). Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J Neurosci* **22**, 6309-6314.
- Gotlieb, A.I., Subrahmanyam, L., and Kalnins, V.I.** (1983). Microtubule-organizing centers and cell migration: effect of inhibition of migration and microtubule disruption in endothelial cells. *J Cell Biol* **96**, 1266-1272.
- Gotlieb, A.I., May, L.M., Subrahmanyam, L., and Kalnins, V.I.** (1981). Distribution of microtubule organizing centers in migrating sheets of endothelial cells. *J Cell Biol* **91**, 589-594.
- Gotz, M.** (2003). Doublecortin finds its place. *Nat Neurosci* **6**, 1245-1247.
- Gotz, M., and Huttner, W.B.** (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 777-788.
- Gotz, M., Hartfuss, E., and Malatesta, P.** (2002). Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice. *Brain Res Bull* **57**, 777-788.
- Gouin, E., Welch, M.D., and Cossart, P.** (2005). Actin-based motility of intracellular pathogens. *Curr Opin Microbiol* **8**, 35-45.
- Grabham, P.W., Seale, G.E., Bennecib, M., Goldberg, D.J., and Vallee, R.B.** (2007). Cytoplasmic dynein and LIS1 are required for microtubule advance during growth cone remodeling and fast axonal outgrowth. *J Neurosci* **27**, 5823-5834.
- Gregory, W.A., Edmondson, J.C., Hatten, M.E., and Mason, C.A.** (1988). Cytology and neuron-glia apposition of migrating cerebellar granule cells in vitro. *J Neurosci* **8**, 1728-1738.
- Grigoriev, I.S., Chernobelskaya, A.A., and Vorobjev, I.A.** (1999). Nocodazole, vinblastine and taxol at low concentrations affect fibroblast locomotion and saltatory movements of organelles. *Membr Cell Biol* **13**, 23-48.
- Grigoriou, M., Tucker, A.S., Sharpe, P.T., and Pachnis, V.** (1998). Expression and regulation of Lhx6 and Lhx7, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development. *Development* **125**, 2063-2074.
- Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R.D., Shumaker, D.K., and Wilson, K.L.** (2005). The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 21-31.
- Guillemot, F.** (2005). Cellular and molecular control of neurogenesis in the mammalian telencephalon. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 639-647.
- Guillemot, F.** (2005). Cellular and molecular control of neurogenesis in the mammalian telencephalon. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 639-647.
- Guillemot, F.** (2007). Cortical interneurons refuse to follow the PAK. *Neuron* **54**, 845-847.
- Gulacsi, A., and Lillien, L.** (2003). Sonic hedgehog and bone morphogenetic protein regulate interneuron development from dorsal telencephalic progenitors in vitro. *J Neurosci* **23**, 9862-9872.
- Gundersen, G.G., and Bulinski, J.C.** (1988). Selective stabilization of microtubules oriented toward the direction of cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5946-5950.
- Gupta, A., Tsai, L.H., and Wynshaw-Boris, A.** (2002). Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Genet* **3**, 342-355.
- Gupta, A., Sanada, K., Miyamoto, D.T., Rovelstad, S., Nadarajah, B., Pearlman, A.L., Brunstrom, J., and Tsai, L.H.** (2003). Layering defect in p35 deficiency is linked to improper neuronal-glia interaction in radial migration. *Nat Neurosci* **6**, 1284-1291.
- Habas, R., and Dawid, I.B.** (2005). Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *J Biol* **4**, 2.
- Hack, I., Bancila, M., Loulier, K., Carroll, P., and Cremer, H.** (2002). Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nat Neurosci* **5**, 939-945.
- Hafezparast, M., Klocke, R., Ruhrberg, C., Marquardt, A., Ahmad-Annuar, A., Bowen, S., Lalli, G., Witherden, A.S., Hummerich, H., Nicholson, S., Morgan, P.J., Oozageer, R., Priestley, J.V., Averill, S., King, V.R., Ball, S., Peters, J., Toda, T., Yamamoto, A., Hiraoka, Y., Augustin, M., Korthaus, D., Wattler, S., Wabnitz, P., Dickneite, C., Lampel, S., Boehme, F., Peraus, G., Popp, A., Rudelius, M., Schlegel, J., Fuchs, H., Hrabe de Angelis, M., Schiavo, G., Shima, D.T., Russ, A.P., Stumm, G., Martin, J.E., and Fisher, E.M.** (2003). Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* **300**, 808-812.
- Hall, A.** (2005). Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* **33**, 891-895.
- Hall, A.** (2005). Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* **33**, 891-895.
- Hallonet, M., Hollemann, T., Wehr, R., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Pieler, T., and Gruss, P.** (1998). Vax1 is a novel homeobox-containing gene expressed in the developing anterior ventral forebrain. *Development* **125**, 2599-2610.
- Hammond, V., Tsai, L.H., and Tan, S.S.** (2004). Control of cortical neuron migration and layering: cell and non cell-autonomous effects of p35. *J Neurosci* **24**, 576-587.

**Hamon, M., Doucet, E., Lefevre, K., Miquel, M.C., Lanfumey, L., Insausti, R., Frechilla, D., Del Rio, J., and Verge, D.** (1999). Antibodies and antisense oligonucleotide for probing the distribution and putative functions of central 5-HT<sub>6</sub> receptors. *Neuropsychopharmacology* **21**, 68S-76S.

**Hand, R., Bortone, D., Mattar, P., Nguyen, L., Heng, J.I., Guerrier, S., Boutt, E., Peters, E., Barnes, A.P., Parras, C., Schuurmans, C., Guillemot, F., and Polleux, F.** (2005). Phosphorylation of Neurogenin2 specifies the migration properties and the dendritic morphology of pyramidal neurons in the neocortex. *Neuron* **48**, 45-62.

**Handel, M., Schulz, S., Stanarius, A., Schreff, M., Erdtmann-Vourliotis, M., Schmidt, H., Wolf, G., and Holtt, V.** (1999). Selective targeting of somatostatin receptor 3 to neuronal cilia. *Neuroscience* **89**, 909-926.

**Hannan, A.J., Servotte, S., Katsnelson, A., Sisodiya, S., Blakemore, C., Squier, M., and Molnar, Z.** (1999). Characterization of nodular neuronal heterotopia in children. *Brain* **122** ( Pt 2), 219-238.

**Harada, A., Takei, Y., Kanai, Y., Tanaka, Y., Nonaka, S., and Hirokawa, N.** (1998). Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. *J Cell Biol* **141**, 51-59.

**Harden, N., Lee, J., Loh, H.Y., Ong, Y.M., Tan, I., Leung, T., Manser, E., and Lim, L.** (1996). A Drosophila homolog of the Rac- and Cdc42-activated serine/threonine kinase PAK is a potential focal adhesion and focal complex protein that colocalizes with dynamic actin structures. *Mol Cell Biol* **16**, 1896-1908.

**Harding, B.** (1996). Gray matter heterotopia., 81-88.

**Hartshorne, D.J., Ito, M., and Erdodi, F.** (2004). Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase. *J Biol Chem* **279**, 37211-37214.

**Hatten, M.E., and Mason, C.A.** (1990). Mechanisms of glial-guided neuronal migration in vitro and in vivo. *Experientia* **46**, 907-916.

**Hatten, M.E., Schachner, M., and Sidman, R.L.** (1979). Histochemical characterization of lectin binding in mouse cerebellum. *Neuroscience* **4**, 921-935.

**Hatten, M.E., Liem, R.K., and Mason, C.A.** (1984). Two forms of cerebellar glial cells interact differently with neurons in vitro. *J Cell Biol* **98**, 193-204.

**Hatten, M.E., Mason, C.A., Liem, R.K., Edmondson, J.C., Bovolenta, P., and Shelanski, M.L.** (1984). Neuron-astroglial interactions in vitro and their implications for repair of CNS injury. *Cent Nerv Syst Trauma* **1**, 15-27.

**Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H., and Inoue, K.** (1994). Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase [corrected]. *Nature* **370**, 216-218.

**Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., and Huttner, W.B.** (2004). Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3196-3201.

**Hayashi, K., Kawai-Hirai, R., Harada, A., and Takata, K.** (2003). Inhibitory neurons from fetal rat cerebral cortex exert delayed axon formation and active migration in vitro. *J Cell Sci* **116**, 4419-4428.

**Haydar, T.F., Wang, F., Schwartz, M.L., and Rakic, P.** (2000). Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci* **20**, 5764-5774.

**He, W., Ingraham, C., Rising, L., Goderie, S., and Temple, S.** (2001). Multipotent stem cells from the mouse basal forebrain contribute GABAergic neurons and oligodendrocytes to the cerebral cortex during embryogenesis. *J Neurosci* **21**, 8854-8862.

**Heald, R.** (2000). Motor function in the mitotic spindle. *Cell* **102**, 399-402.

**Helfand, B.T., Chang, L., and Goldman, R.D.** (2003). The dynamic and motile properties of intermediate filaments. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 445-467.

**Helfand, B.T., Chang, L., and Goldman, R.D.** (2004). Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *J Cell Sci* **117**, 133-141.

**Henneguy, L.** (1898). Sur les rapports des cils vibratiles avec les centrosomes., 481-496.

**Herrmann, H., Bar, H., Kreplak, L., Strelkov, S.V., and Aebi, U.** (2007). Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 562-573.

**Hevner, R.F., Neogi, T., Englund, C., Daza, R.A., and Fink, A.** (2003). Cajal-Retzius cells in the mouse: transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin. *Brain Res Dev Brain Res* **141**, 39-53.

**Hevner, R.F., Shi, L., Justice, N., Hsueh, Y., Sheng, M., Smiga, S., Bulfone, A., Goffinet, A.M., Campagnoni, A.T., and Rubenstein, J.L.** (2001). *Tbr1* regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* **29**, 353-366.

**Higginbotham, H.R., and Gleeson, J.G.** (2007). The centrosome in neuronal development. *Trends Neurosci* **30**, 276-283.

**Higginbotham, H., Tanaka, T., Brinkman, B.C., and Gleeson, J.G.** (2006). GSK3 $\beta$  and PKC $\zeta$  function in centrosome localization and process stabilization during Slit-mediated neuronal repolarization. *Mol Cell Neurosci* **32**, 118-132.

**Hirokawa, N.** (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* **279**, 519-526.



- Hirokawa, N., Sato-Yoshitake, R., Yoshida, T., and Kawashima, T.** (1990). Brain dynein (MAP1C) localizes on both anterogradely and retrogradely transported membranous organelles in vivo. *J Cell Biol* **111**, 1027-1037.
- Hirotsune, S., Fleck, M.W., Gambello, M.J., Bix, G.J., Chen, A., Clark, G.D., Ledbetter, D.H., McBain, C.J., and Wynshaw-Boris, A.** (1998). Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nat Genet* **19**, 333-339.
- Ho, P.T., and Tucker, R.W.** (1989). Centriole ciliation and cell cycle variability during G1 phase of BALB/c 3T3 cells. *J Cell Physiol* **139**, 398-406.
- Hochman, E., Castiel, A., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., and Izraeli, S.** (2006). Molecular pathways regulating pro-migratory effects of Hedgehog signaling. *J Biol Chem* **281**, 33860-33870.
- Hoebeke, J., Van Nijen, G., and De Brabander, M.** (1976). Interaction of oncodazole (R 17934), a new antitumoral drug, with rat brain tubulin. *Biochem Biophys Res Commun* **69**, 319-324.
- Holleran, E.A., Karki, S., and Holzbaur, E.L.** (1998). The role of the dynactin complex in intracellular motility. *Int Rev Cytol* **182**, 69-109.
- Hong, S.E., Shugart, Y.Y., Huang, D.T., Shahwan, S.A., Grant, P.E., Hourihane, J.O., Martin, N.D., and Walsh, C.A.** (2000). Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nat Genet* **26**, 93-96.
- Horowitz, A., Trybus, K.M., Bowman, D.S., and Fay, F.S.** (1994). Antibodies probe for folded monomeric myosin in relaxed and contracted smooth muscle. *J Cell Biol* **126**, 1195-1200.
- Horwitz, R., and Webb, D.** (2003). Cell migration. *Curr Biol* **13**, R756-759.
- Houart, C., Westerfield, M., and Wilson, S.W.** (1998). A small population of anterior cells patterns the forebrain during zebrafish gastrulation. *Nature* **391**, 788-792.
- Howard, W.D., and Timasheff, S.N.** (1988). Linkages between the effects of taxol, colchicine, and GTP on tubulin polymerization. *J Biol Chem* **263**, 1342-1346.
- Hu, H.** (1999). Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron* **23**, 703-711.
- Hu, H., Tomasiewicz, H., Magnuson, T., and Rutishauser, U.** (1996). The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron* **16**, 735-743.
- Huang, Y., Magdaleno, S., Hopkins, R., Slaughter, C., Curran, T., and Keshvara, L.** (2004). Tyrosine phosphorylated Disabled 1 recruits Crk family adapter proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **318**, 204-212.
- Huangfu, D., and Anderson, K.V.** (2006). Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. *Development* **133**, 3-14.
- Hughes, T.E., Zhang, H., Logothetis, D.E., and Berlot, C.H.** (2001). Visualization of a functional Galpha q-green fluorescent protein fusion in living cells. Association with the plasma membrane is disrupted by mutational activation and by elimination of palmitoylation sites, but not by activation mediated by receptors or AIF4. *J Biol Chem* **276**, 4227-4235.
- Hurd, T.W., Fan, S., Liu, C.J., Kweon, H.K., Hakansson, K., and Margolis, B.** (2003). Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 to the polarity protein Par3 regulates cell polarity in mammalian epithelia. *Curr Biol* **13**, 2082-2090.
- Huttner, W.B., and Brand, M.** (1997). Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells. *Curr Opin Neurobiol* **7**, 29-39.
- Huttner, W.B., and Kosodo, Y.** (2005). Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 648-657.
- Ishizaki, T., Morishima, Y., Okamoto, M., Furuyashiki, T., Kato, T., and Narumiya, S.** (2001). Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nat Cell Biol* **3**, 8-14.
- Itoh, Y., Masuyama, N., Nakayama, K., Nakayama, K.I., and Gotoh, Y.** (2007). The cyclin-dependent kinase inhibitors p57 and p27 regulate neuronal migration in the developing mouse neocortex. *J Biol Chem* **282**, 390-396.
- Jana, S.S., Kawamoto, S., and Adelstein, R.S.** (2006). A specific isoform of nonmuscle myosin II-C is required for cytokinesis in a tumor cell line. *J Biol Chem* **281**, 24662-24670.
- Janke, C., Rogowski, K., Wloga, D., Regnard, C., Kajava, A.V., Strub, J.M., Temurak, N., van Dijk, J., Boucher, D., van Dorsselaer, A., Suryavanshi, S., Gaertig, J., and Edde, B.** (2005). Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family. *Science* **308**, 1758-1762.
- Jazwinska, A., Ehler, E., and Hughes, S.M.** (2003). Intermediate filament-co-localized molecules with myosin heavy chain epitopes define distinct cellular domains in hair follicles and epidermis. *BMC Cell Biol* **4**, 10.
- Jefferson, J.J., Leung, C.L., and Liem, R.K.** (2004). Plakins: goliaths that link cell junctions and the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 542-553.
- Jellinger, K., and Rett, A.** (1976). Agyria-pachygyria (lissencephaly syndrome). *Neuropadiatrie* **7**, 66-91.
- Jimenez, D., Lopez-Mascaraque, L.M., Valverde, F., and De Carlos, J.A.** (2002). Tangential migration in neocortical development. *Dev Biol* **244**, 155-169.
- Job, D., Valiron, O., and Oakley, B.** (2003). Microtubule nucleation. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 111-117.

- Joberty, G., Petersen, C., Gao, L., and Macara, I.G.** (2000). The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol* **2**, 531-539.
- Jordan, M.A., and Wilson, L.** (1998). Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 123-130.
- Jordan, M.A., Thrower, D., and Wilson, L.** (1992). Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J Cell Sci* **102** ( Pt 3), 401-416.
- Kakita, A., Hayashi, S., Moro, F., Guerrini, R., Ozawa, T., Ono, K., Kameyama, S., Walsh, C.A., and Takahashi, H.** (2002). Bilateral periventricular nodular heterotopia due to filamin 1 gene mutation: widespread glomeruloid microvascular anomaly and dysplastic cytoarchitecture in the cerebral cortex. *Acta Neuropathol* **104**, 649-657.
- Kamiya, A., Kubo, K., Tomoda, T., Takaki, M., Youn, R., Ozeki, Y., Sawamura, N., Park, U., Kudo, C., Okawa, M., Ross, C.A., Hatten, M.E., Nakajima, K., and Sawa, A.** (2005). A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat Cell Biol* **7**, 1167-1178.
- Kamiya, A., Kubo, K., Tomoda, T., Takaki, M., Youn, R., Ozeki, Y., Sawamura, N., Park, U., Kudo, C., Okawa, M., Ross, C.A., Hatten, M.E., Nakajima, K., and Sawa, A.** (2005). A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat Cell Biol* **7**, 1167-1178.
- Kappeler, C., Saillour, Y., Baudoin, J.P., Tuy, F.P., Alvarez, C., Houbron, C., Gaspar, P., Hamard, G., Chelly, J., Metin, C., and Francis, F.** (2006). Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from doublecortin knockout mice. *Hum Mol Genet* **15**, 1387-1400.
- Kato, K., Chihara, T., and Hayashi, S.** (2004). Hedgehog and Decapentaplegic instruct polarized growth of cell extensions in the *Drosophila* trachea. *Development* **131**, 5253-5261.
- Katsumoto, T., Higaki, K., Ohno, K., and Onodera, K.** (1994). The orientation of primary cilia during the wound response in 3Y1 cells. *Biol Cell* **81**, 17-21.
- Kawaguchi, Y., and Kubota, Y.** (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* **7**, 476-486.
- Kawamura, K., Nanami, T., Kikuchi, Y., and Kitakami, A.** (1988). Grafted granule and Purkinje cells can migrate into the mature cerebellum of normal adult rats. *Exp. Brain Res.* **70**, 477-484.
- Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y., and Hoshino, M.** (2003). The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration. *Embo J* **22**, 4190-4201.
- Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y., and Hoshino, M.** (2006). Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27kip1 contributing to actin organization and cortical neuronal migration. *Nat Cell Biol* **8**, 17-26.
- Kawauchi, T., Chihama, K., Nishimura, Y.V., Nabeshima, Y., and Hoshino, M.** (2005). MAP1B phosphorylation is differentially regulated by Cdk5/p35, Cdk5/p25, and JNK. *Biochem Biophys Res Commun* **331**, 50-55.
- Kholmanskikh, S.S., Dobrin, J.S., Wynshaw-Boris, A., Letourneau, P.C., and Ross, M.E.** (2003). Disregulated RhoGTPases and actin cytoskeleton contribute to the migration defect in Lis1-deficient neurons. *J Neurosci* **23**, 8673-8681.
- Kholmanskikh, S.S., Koeller, H.B., Wynshaw-Boris, A., Gomez, T., Letourneau, P.C., and Ross, M.E.** (2006). Calcium-dependent interaction of Lis1 with IQGAP1 and Cdc42 promotes neuronal motility. *Nat Neurosci* **9**, 50-57.
- Kim, S., and Coulombe, P.A.** (2007). Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev* **21**, 1581-1597.
- Kim, K.Y., Kovacs, M., Kawamoto, S., Sellers, J.R., and Adelstein, R.S.** (2005). Disease-associated mutations and alternative splicing alter the enzymatic and motile activity of nonmuscle myosins II-B and II-C. *J Biol Chem* **280**, 22769-22775.
- Kim, K.Y., Kawamoto, S., Bao, J., Sellers, J.R., and Adelstein, R.S.** (2007). The B2 alternatively spliced isoform of nonmuscle myosin II-B lacks actin-activated MgATPase activity and in vitro motility. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Kim, H.M., Qu, T., Kriho, V., Lacor, P., Smalheiser, N., Pappas, G.D., Guidotti, A., Costa, E., and Sugaya, K.** (2002). Reelin function in neural stem cell biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4020-4025.
- Kimura, N., Ueno, M., Nakashima, K., and Taga, T.** (1999). A brain region-specific gene product Lhx6.1 interacts with Ldb1 through tandem LIM-domains. *J Biochem* **126**, 180-187.
- King, S.M.** (2000). The dynein microtubule motor. *Biochim Biophys Acta* **1496**, 60-75.
- Kirschner, M.W., and Mitchison, T.** (1986). Microtubule dynamics. *Nature* **324**, 621.
- Kirschner, M., and Schulze, E.** (1986). Morphogenesis and the control of microtubule dynamics in cells. *J Cell Sci Suppl* **5**, 293-310.
- Kizhatil, K., Wu, Y.X., Sen, A., and Bennett, V.** (2002). A new activity of doublecortin in recognition of the phospho-FIGQY tyrosine in the cytoplasmic domain of neurofascin. *J Neurosci* **22**, 7948-7958.
- Klein, T.J., and Mlodzik, M.** (2005). Planar cell polarization: an emerging model points in the right direction. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 155-176.

- Klotz, C., Bordes, N., Laine, M.C., Sandoz, D., and Bornens, M.** (1986). A protein of 175,000 daltons associated with striated rootlets in ciliated epithelia, as revealed by a monoclonal antibody. *Cell Motil Cytoskeleton* **6**, 56-67.
- Kobayashi, S., Ishiguro, K., Omori, A., Takamatsu, M., Arioka, M., Imahori, K., and Uchida, T.** (1993). A cdc2-related kinase PSSALRE/cdk5 is homologous with the 30 kDa subunit of tau protein kinase II, a proline-directed protein kinase associated with microtubule. *FEBS Lett* **335**, 171-175.
- Koizumi, H., Higginbotham, H., Poon, T., Tanaka, T., Brinkman, B.C., and Gleeson, J.G.** (2006). Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain. *Nat Neurosci* **9**, 779-786.
- Kolpak, A., Zhang, J., and Bao, Z.Z.** (2005). Sonic hedgehog has a dual effect on the growth of retinal ganglion axons depending on its concentration. *J Neurosci* **25**, 3432-3441.
- Kosodo, Y., Roper, K., Haubensak, W., Marzesco, A.M., Corbeil, D., and Huttner, W.B.** (2004). Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *Embo J* **23**, 2314-2324.
- Kovar, D.R.** (2006). Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 11-17.
- Krause, M., Dent, E.W., Bear, J.E., Loureiro, J.J., and Gertler, F.B.** (2003). Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 541-564.
- Kriegstein, A.R., and Noctor, S.C.** (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci* **27**, 392-399.
- Kuntziger, T., Gavet, O., Manceau, V., Sobel, A., and Bornens, M.** (2001). Stathmin/Op18 phosphorylation is regulated by microtubule assembly. *Mol Biol Cell* **12**, 437-448.
- Kupfer, A., Louvard, D., and Singer, S.J.** (1982). Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in cultured fibroblasts at the edge of an experimental wound. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 2603-2607.
- Lafanechere, L., Courtay-Cahen, C., Kawakami, T., Jacrot, M., Rudiger, M., Wehland, J., Job, D., and Margolis, R.L.** (1998). Suppression of tubulin tyrosine ligase during tumor growth. *J Cell Sci* **111** ( Pt 2), 171-181.
- Lambert de Rouvroit, C., and Goffinet, A.M.** (1998). The reeler mouse as a model of brain development. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **150**, 1-106.
- Lavdas, A.A., Grigoriou, M., Pachnis, V., and Parnavelas, J.G.** (1999). The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* **19**, 7881-7888.
- Lawrence, C.J., Dawe, R.K., Christie, K.R., Cleveland, D.W., Dawson, S.C., Endow, S.A., Goldstein, L.S., Goodson, H.V., Hirokawa, N., Howard, J., Malmberg, R.L., McIntosh, J.R., Miki, H., Mitchison, T.J., Okada, Y., Reddy, A.S., Saxton, W.M., Schliwa, M., Scholey, J.M., Vale, R.D., Walczak, C.E., and Wordeman, L.** (2004). A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol* **167**, 19-22.
- Lee, J.C., Field, D.J., and Lee, L.L.** (1980). Effects of nocodazole on structures of calf brain tubulin. *Biochemistry* **19**, 6209-6215.
- Lee, S.M., Tole, S., Grove, E., and McMahon, A.P.** (2000). A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development* **127**, 457-467.
- Leeuwen, F.N., Kain, H.E., Kammen, R.A., Michiels, F., Kranenburg, O.W., and Collard, J.G.** (1997). The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho. *J Cell Biol* **139**, 797-807.
- Lei, Y., and Warrior, R.** (2000). The *Drosophila* Lissencephaly1 (DLis1) gene is required for nuclear migration. *Dev Biol* **226**, 57-72.
- Lemullois, M., Gounon, P., and Sandoz, D.** (1987). Relationships between cytokeratin filaments and centriolar derivatives during ciliogenesis in the quail oviduct. *Biol Cell* **61**, 39-49.
- Lemullois, M., Boisvieux-Ulrich, E., Laine, M.C., Chailley, B., and Sandoz, D.** (1988). Development and functions of the cytoskeleton during ciliogenesis in metazoa. *Biol Cell* **63**, 195-208.
- Lenhossek, M.** (1898). Ueber Flimmerzellen., 106-128.
- Letinic, K., and Rakic, P.** (2001). Telencephalic origin of human thalamic GABAergic neurons. *Nat Neurosci* **4**, 931-936.
- Letinic, K., Zoncu, R., and Rakic, P.** (2002). Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature* **417**, 645-649.
- Lew, J., Beaudette, K., Litwin, C.M., and Wang, J.H.** (1992). Purification and characterization of a novel proline-directed protein kinase from bovine brain. *J Biol Chem* **267**, 13383-13390.
- Lew, J., Huang, Q.Q., Qi, Z., Winkfein, R.J., Aebersold, R., Hunt, T., and Wang, J.H.** (1994). A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* **371**, 423-426.
- Li, Y.Y., Yeh, E., Hays, T., and Bloom, K.** (1993). Disruption of mitotic spindle orientation in a yeast dynein mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10096-10100.

- Liao, G., Nagasaki, T., and Gundersen, G.G.** (1995). Low concentrations of nocodazole interfere with fibroblast locomotion without significantly affecting microtubule level: implications for the role of dynamic microtubules in cell locomotion. *J Cell Sci* **108** ( Pt 11), 3473-3483.
- Lin, L.F., Doherty, D.H., Lile, J.D., Bektesh, S., and Collins, F.** (1993). GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* **260**, 1130-1132.
- Lin, F., Hiesberger, T., Cordes, K., Sinclair, A.M., Goldstein, L.S., Somlo, S., and Igarashi, P.** (2003). Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5286-5291.
- Liodis, P., Denaxa, M., Grigoriou, M., Akufo-Addo, C., Yanagawa, Y., and Pachnis, V.** (2007). Lhx6 activity is required for the normal migration and specification of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci* **27**, 3078-3089.
- Liu, B.P., Chrzanowska-Wodnicka, M., and Burridge, K.** (1998). Microtubule depolymerization induces stress fibers, focal adhesions, and DNA synthesis via the GTP-binding protein Rho. *Cell Adhes Commun* **5**, 249-255.
- Liu, Z., Steward, R., and Luo, L.** (2000). Drosophila Lis1 is required for neuroblast proliferation, dendritic elaboration and axonal transport. *Nat Cell Biol* **2**, 776-783.
- Liu, X., Udovichenko, I.P., Brown, S.D., Steel, K.P., and Williams, D.S.** (1999). Myosin VIIa participates in opsin transport through the photoreceptor cilium. *J Neurosci* **19**, 6267-6274.
- Liu, W., Murcia, N.S., Duan, Y., Weinbaum, S., Yoder, B.K., Schwiebert, E., and Satlin, L.M.** (2005). Mechanoregulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration is attenuated in collecting duct of monocilium-impaired orpk mice. *Am J Physiol Renal Physiol* **289**, F978-988.
- Lo, C.M., Buxton, D.B., Chua, G.C., Dembo, M., Adelstein, R.S., and Wang, Y.L.** (2004). Nonmuscle myosin IIb is involved in the guidance of fibroblast migration. *Mol Biol Cell* **15**, 982-989.
- Lois, C., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A.** (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science* **271**, 978-981.
- Lopez-Bendito, G., Lujan, R., Shigemoto, R., Ganter, P., Paulsen, O., and Molnar, Z.** (2003). Blockade of GABA(B) receptors alters the tangential migration of cortical neurons. *Cereb Cortex* **13**, 932-942.
- LoTurco, J.J., and Bai, J.** (2006). The multipolar stage and disruptions in neuronal migration. *Trends Neurosci* **29**, 407-413.
- LoTurco, J.J., Sarkisian, M.R., Cosker, L., and Bai, J.** (2003). Citron kinase is a regulator of mitosis and neurogenic cytokinesis in the neocortical ventricular zone. *Cereb Cortex* **13**, 588-591.
- LoTurco, J.J., Owens, D.F., Heath, M.J., Davis, M.B., and Kriegstein, A.R.** (1995). GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* **15**, 1287-1298.
- Loulier, K., Ruat, M., and Traiffort, E.** (2005). Analysis of hedgehog interacting protein in the brain and its expression in nitric oxide synthase-positive cells. *Neuroreport* **16**, 1959-1962.
- Luders, J., and Stearns, T.** (2007). Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 161-167.
- Lund, J.S., and Lewis, D.A.** (1993). Local circuit neurons of developing and mature macaque prefrontal cortex: Golgi and immunocytochemical characteristics. *J Comp Neurol* **328**, 282-312.
- Ma, S., and Chisholm, R.L.** (2002). Cytoplasmic dynein-associated structures move bidirectionally in vivo. *J Cell Sci* **115**, 1453-1460.
- Ma, X., Kawamoto, S., Hara, Y., and Adelstein, R.S.** (2004). A point mutation in the motor domain of nonmuscle myosin II-B impairs migration of distinct groups of neurons. *Mol Biol Cell* **15**, 2568-2579.
- Machesky, L.M.** (1999). Rocket-based motility: a universal mechanism? *Nat Cell Biol* **1**, E29-31.
- Maciver, S.K., and Hussey, P.J.** (2002). The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Genome Biol* **3**, reviews3007.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., and Narumiya, S.** (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* **285**, 895-898.
- Maggi, R., Cariboni, A., Zaninetti, R., Samara, A., Stossi, F., Pimpinelli, F., Giacobini, P., Consalez, G.G., Rugarli, E., and Piva, F.** (2005). Factors involved in the migration of neuroendocrine hypothalamic neurons. *Arch Ital Biol* **143**, 171-178.
- Magini, G.** (1888). Sur la neuroglie et les cellules nerveuses cerebrales chez les foetus. *Arch Ital Biol* **9**, 59-60.
- Malone, C.J., Misner, L., Le Bot, N., Tsai, M.C., Campbell, J.M., Ahringer, J., and White, J.G.** (2003). The *C. elegans* hook protein, ZYG-12, mediates the essential attachment between the centrosome and nucleus. *Cell* **115**, 825-836.
- Mammoto, A., Huang, S., and Ingber, D.E.** (2007). Filamin links cell shape and cytoskeletal structure to Rho regulation by controlling accumulation of p190RhoGAP in lipid rafts. *J Cell Sci* **120**, 456-467.
- Manent, J.B., Jorquera, I., Ben-Ari, Y., Aniksztejn, L., and Represa, A.** (2006). Glutamate acting on AMPA but not NMDA receptors modulates the migration of hippocampal interneurons. *J Neurosci* **26**, 5901-5909.

- Manent, J.B., Demarque, M., Jorquera, I., Pellegrino, C., Ben-Ari, Y., Aniksztejn, L., and Represa, A.** (2005). A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. *J Neurosci* **25**, 4755-4765.
- Manser, E., Huang, H.Y., Loo, T.H., Chen, X.Q., Dong, J.M., Leung, T., and Lim, L.** (1997). Expression of constitutively active alpha-PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes. *Mol Cell Biol* **17**, 1129-1143.
- Manuel, M., and Price, D.J.** (2005). Role of Pax6 in forebrain regionalization. *Brain Res Bull* **66**, 387-393.
- Margolis, B., and Borg, J.P.** (2005). Apicobasal polarity complexes. *J Cell Sci* **118**, 5157-5159.
- Marin, O., and Rubenstein, J.L.** (2001). A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* **2**, 780-790.
- Marin, O., and Rubenstein, J.L.** (2003). Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* **26**, 441-483.
- Marin, O., Anderson, S.A., and Rubenstein, J.L.** (2000). Origin and molecular specification of striatal interneurons. *J Neurosci* **20**, 6063-6076.
- Marin, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., and Rubenstein, J.L.** (2001). Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* **293**, 872-875.
- Marin, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., and Rubenstein, J.L.** (2001). Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* **293**, 872-875.
- Marin, O., Plump, A.S., Flames, N., Sanchez-Camacho, C., Tessier-Lavigne, M., and Rubenstein, J.L.** (2003). Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on subcortical Slit1/2-independent repulsion and cortical attraction. *Development* **130**, 1889-1901.
- Marin, O., Plump, A.S., Flames, N., Sanchez-Camacho, C., Tessier-Lavigne, M., and Rubenstein, J.L.** (2003). Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on subcortical Slit1/2-independent repulsion and cortical attraction. *Development* **130**, 1889-1901.
- 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.** (1998). Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends Neurosci* **21**, 64-71.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., and Wu, C.** (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* **5**, 793-807.
- Masuda, T., Isobe, Y., Aihara, N., Furuyama, F., Misumi, S., Kim, T.S., Nishino, H., and Hida, H.** (2007). Increase in neurogenesis and neuroblast migration after a small intracerebral hemorrhage in rats. *Neurosci Lett* **425**, 114-119.
- Mataraza, J.M., Briggs, M.W., Li, Z., Entwistle, A., Ridley, A.J., and Sacks, D.B.** (2003). IQGAP1 promotes cell motility and invasion. *J Biol Chem* **278**, 41237-41245.
- Matsumura, F.** (2005). Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol* **15**, 371-377.
- Matsumura, F.** (2005). Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol* **15**, 371-377.
- Matsuo, N., Terao, M., Nabeshima, Y., and Hoshino, M.** (2003). Roles of STEF/Tiam1, guanine nucleotide exchange factors for Rac1, in regulation of growth cone morphology. *Mol Cell Neurosci* **24**, 69-81.
- McConnell, S.K.** (1995). Constructing the cerebral cortex: neurogenesis and fate determination. *Neuron* **15**, 761-768.
- McMahon, A.P., Ingham, P.W., and Tabin, C.J.** (2003). Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol* **53**, 1-114.
- McManus, M.F., Nasrallah, I.M., Gopal, P.P., Baek, W.S., and Golden, J.A.** (2004). Axon mediated interneuron migration. *J Neuropathol Exp Neurol* **63**, 932-941.
- McManus, M.F., Nasrallah, I.M., Pancoast, M.M., Wynshaw-Boris, A., and Golden, J.A.** (2004). Lis1 is necessary for normal non-radial migration of inhibitory interneurons. *Am J Pathol* **165**, 775-784.
- Meng, H., Smith, S.D., Hager, K., Held, M., Liu, J., Olson, R.K., Pennington, B.F., DeFries, J.C., Gelernter, J., O'Reilly-Pol, T., Somlo, S., Skudlarski, P., Shaywitz, S.E., Shaywitz, B.A., Marchione, K., Wang, Y., Paramasivam, M., LoTurco, J.J., Page, G.P., and Gruen, J.R.** (2005). DCDC2 is associated with reading disability and modulates neuronal development in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17053-17058.
- Mermall, V., Post, P.L., and Mooseker, M.S.** (1998). Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* **279**, 527-533.
- Mesngon, M.T., Tarricone, C., Hebbar, S., Guillotte, A.M., Schmitt, E.W., Lanier, L., Musacchio, A., King, S.J., and Smith, D.S.** (2006). Regulation of cytoplasmic dynein ATPase by Lis1. *J Neurosci* **26**, 2132-2139.
- Messaoudii, C., Boudier, T., Sanchez Sorzano, C.O., and Marco, S.** (2007). TomoJ: tomography software for three-dimensional reconstruction in transmission electron microscopy. *BMC Bioinformatics* **8**, 288. **Metin, C.,**



**and Godement, P.** (1996). The ganglionic eminence may be an intermediate target for corticofugal and thalamocortical axons. *J Neurosci* **16**, 3219-3235.

**Metin, C., Denizot, J.P., and Ropert, N.** (2000). Intermediate zone cells express calcium-permeable AMPA receptors and establish close contact with growing axons. *J Neurosci* **20**, 696-708.

**Metin, C., Baudoin, J.P., Rakic, S., and Parnavelas, J.G.** (2006). Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. *Eur J Neurosci* **23**, 894-900.

**Metin, C., Alvarez, C., Moudoux, D., Vitalis, T., Pieau, C., and Molnar, Z.** (2007). Conserved pattern of tangential neuronal migration during forebrain development. *Development* **134**, 2815-2827.

**Meyer, G., Perez-Garcia, C.G., and Gleeson, J.G.** (2002). Selective expression of doublecortin and LIS1 in developing human cortex suggests unique modes of neuronal movement. *Cereb Cortex* **12**, 1225-1236.

**Meyer, G., Soria, J.M., Martinez-Galan, J.R., Martin-Clemente, B., and Fairen, A.** (1998). Different origins and developmental histories of transient neurons in the marginal zone of the fetal and neonatal rat cortex. *J Comp Neurol* **397**, 493-518.

**Miki, H., Okada, Y., and Hirokawa, N.** (2005). Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends Cell Biol* **15**, 467-476.

**Mimori-Kiyosue, Y., Shiina, N., and Tsukita, S.** (2000). The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr Biol* **10**, 865-868.

**Mitchell, B.D., Gibbons, B., Allen, L.R., Stella, J., and D'Mello, S.R.** (2001). Aberrant apoptosis in the neurological mutant Flathead is associated with defective cytokinesis of neural progenitor cells. *Brain Res Dev Brain Res* **130**, 53-63.

**Mitchison, T.J., and Cramer, L.P.** (1996). Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* **84**, 371-379.

**Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H., and Ogawa, M.** (2001). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* **31**, 727-741.

**Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T., and Ogawa, M.** (2004). Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* **131**, 3133-3145.

**Moers, A., Nurnberg, A., Goebbels, S., Wettschureck, N., and Offermanns, S.** (2007). G $\alpha$ 12/G $\alpha$ 13-deficiency causes localized overmigration of neurons in the developing cerebral and cerebellar cortices. *Mol Cell Biol*.

**Moir, R.D., Yoon, M., Khuon, S., and Goldman, R.D.** (2000). Nuclear lamins A and B1: different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells. *J Cell Biol* **151**, 1155-1168.

**Monuki, E.S., and Walsh, C.A.** (2001). Mechanisms of cerebral cortical patterning in mice and humans. *Nat Neurosci* **4 Suppl**, 1199-1206.

**Morest, D.K.** (1970). A study of neurogenesis in the forebrain of opossum pouch young. *Z Anat Entwicklungsgesch* **130**, 265-305.

**Morest, D.K.** (1970). A study of neurogenesis in the forebrain of opossum pouch young. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **130**, 265-305.

**Morgan, D., Eley, L., Sayer, J., Strachan, T., Yates, L.M., Craighead, A.S., and Goodship, J.A.** (2002). Expression analyses and interaction with the anaphase promoting complex protein Apc2 suggest a role for inversin in primary cilia and involvement in the cell cycle. *Hum Mol Genet* **11**, 3345-3350.

**Morin, X., Jaouen, F., and Durbec, P.** (2007). Control of planar divisions by the G-protein regulator LGN maintains progenitors in the chick neuroepithelium. *Nat Neurosci* **10**, 1440-1448.

**Morris, N.R.** (2003). Nuclear positioning: the means is at the ends. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 54-59.

**Morris, N.R., Efimov, V.P., and Xiang, X.** (1998). Nuclear migration, nucleokinesis and lissencephaly. *Trends Cell Biol* **8**, 467-470.

**Moya, F., and Valdeolillos, M.** (2004). Polarized increase of calcium and nucleokinesis in tangentially migrating neurons. *Cereb Cortex* **14**, 610-618.

**Muenke, M., and Beachy, P.A.** (2000). Genetics of ventral forebrain development and holoprosencephaly. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 262-269.

**Murcia, N.S., Richards, W.G., Yoder, B.K., Mucenski, M.L., Dunlap, J.R., and Woychik, R.P.** (2000). The Oak Ridge Polycystic Kidney (orpk) disease gene is required for left-right axis determination. *Development* **127**, 2347-2355.

**Muzio, L., DiBenedetto, B., Stoykova, A., Boncinelli, E., Gruss, P., and Mallamaci, A.** (2002). Conversion of cerebral cortex into basal ganglia in Emx2(-/-) Pax6(Sey/Sey) double-mutant mice. *Nat Neurosci* **5**, 737-745.

**Nadarajah, B.** (2003). Radial glia and somal translocation of radial neurons in the developing cerebral cortex. *Glia* **43**, 33-36.

**Nadarajah, B., and Parnavelas, J.G.** (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* **3**, 423-432.

**Nadarajah, B., Alifragis, P., Wong, R.O., and Parnavelas, J.G.** (2002). Ventricle-directed migration in the developing cerebral cortex. *Nat Neurosci* **5**, 218-224.

**Nadarajah, B., Alifragis, P., Wong, R.O., and Parnavelas, J.G.** (2003). Neuronal migration in the developing cerebral cortex: observations based on real-time imaging. *Cereb Cortex* **13**, 607-611.

**Nadarajah, B., Brunstrom, J.E., Grutzendler, J., Wong, R.O., and Pearlman, A.L.** (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci* **4**, 143-150.

**Nagano, T., Morikubo, S., and Sato, M.** (2004). Filamin A and FILIP (Filamin A-Interacting Protein) regulate cell polarity and motility in neocortical subventricular and intermediate zones during radial migration. *J Neurosci* **24**, 9648-9657.

**Nagano, T., Yoneda, T., Hatanaka, Y., Kubota, C., Murakami, F., and Sato, M.** (2002). Filamin A-interacting protein (FILIP) regulates cortical cell migration out of the ventricular zone. *Nat Cell Biol* **4**, 495-501.

**Nelson, W.J.** (2003). Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* **422**, 766-774.

**Nery, S., Fishell, G., and Corbin, J.G.** (2002). The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nat Neurosci* **5**, 1279-1287.

**Nery, S., Corbin, J.G., and Fishell, G.** (2003). Dlx2 progenitor migration in wild type and Nkx2.1 mutant telencephalon. *Cereb Cortex* **13**, 895-903.

**Nguyen, L., Malgrange, B., Breuskin, I., Bettendorff, L., Moonen, G., Belachew, S., and Rigo, J.M.** (2003). Autocrine/paracrine activation of the GABA(A) receptor inhibits the proliferation of neurogenic polysialylated neural cell adhesion molecule-positive (PSA-NCAM+) precursor cells from postnatal striatum. *J Neurosci* **23**, 3278-3294.

**Nguyen, L., Besson, A., Heng, J.I., Schuurmans, C., Teboul, L., Parras, C., Philpott, A., Roberts, J.M., and Guillemot, F.** (2006). p27kip1 independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex. *Genes Dev* **20**, 1511-1524.

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

**Niethammer, M., Smith, D.S., Ayala, R., Peng, J., Ko, J., Lee, M.S., Morabito, M., and Tsai, L.H.** (2000). NUDEL is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein. *Neuron* **28**, 697-711.

**Nikolic, M., Chou, M.M., Lu, W., Mayer, B.J., and Tsai, L.H.** (1998). The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature* **395**, 194-198.

**Nishimura, T., Kato, K., Yamaguchi, T., Fukata, Y., Ohno, S., and Kaibuchi, K.** (2004). Role of the PAR-3-KIF3 complex in the establishment of neuronal polarity. *Nat Cell Biol* **6**, 328-334.

**Nishimura, T., Yamaguchi, T., Kato, K., Yoshizawa, M., Nabeshima, Y., Ohno, S., Hoshino, M., and Kaibuchi, K.** (2005). PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nat Cell Biol* **7**, 270-277.

**Nobes, C.D., and Hall, A.** (1999). Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* **144**, 1235-1244.

**Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., and Kriegstein, A.R.** (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* **7**, 136-144.

**Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A., and Downing, K.H.** (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell* **96**, 79-88.

**Ocbina, P.J., Dizon, M.L., Shin, L., and Szele, F.G.** (2006). Doublecortin is necessary for the migration of adult subventricular zone cells from neurospheres. *Mol Cell Neurosci* **33**, 126-135.

**Ogawa, T., Nitta, R., Okada, Y., and Hirokawa, N.** (2004). A common mechanism for microtubule destabilizers-M type kinesins stabilize curling of the protofilament using the class-specific neck and loops. *Cell* **116**, 591-602.

**Ohshima, T., Gilmore, E.C., Longenecker, G., Jacobowitz, D.M., Brady, R.O., Herrup, K., and Kulkarni, A.B.** (1999). Migration defects of cdk5(-/-) neurons in the developing cerebellum is cell autonomous. *J Neurosci* **19**, 6017-6026.

**Ohshima, T., Gilmore, E.C., Longenecker, G., Jacobowitz, D.M., Brady, R.O., Herrup, K., and Kulkarni, A.B.** (1999). Migration defects of cdk5(-/-) neurons in the developing cerebellum is cell autonomous. *J Neurosci* **19**, 6017-6026.

**Ohshima, T., Ward, J.M., Huh, C.G., Longenecker, G., Veeranna, Pant, H.C., Brady, R.O., Martin, L.J., and Kulkarni, A.B.** (1996). Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11173-11178.

**Ohshima, T., Hirasawa, M., Tabata, H., Mutoh, T., Adachi, T., Suzuki, H., Saruta, K., Iwasato, T., Itohara, S., Hashimoto, M., Nakajima, K., Ogawa, M., Kulkarni, A.B., and Mikoshiba, K.** (2007). Cdk5 is required for multipolar-to-bipolar transition during radial neuronal migration and proper dendrite development of pyramidal neurons in the cerebral cortex. *Development* **134**, 2273-2282.

**Ohta, Y., Hartwig, J.H., and Stossel, T.P.** (2006). FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nat Cell Biol* **8**, 803-814.

**Olenik, C., Aktories, K., and Meyer, D.K.** (1999). Differential expression of the small GTP-binding proteins RhoA, RhoB, Cdc42u and Cdc42b in developing rat neocortex. *Brain Res Mol Brain Res* **70**, 9-17.

**Oliver, G., Mailhos, A., Wehr, R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Gruss, P.** (1995). Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* **121**, 4045-4055.

**Oriolo, A.S., Wald, F.A., Canessa, G., and Salas, P.J.** (2007). GCP6 binds to intermediate filaments: a novel function of keratins in the organization of microtubules in epithelial cells. *Mol Biol Cell* **18**, 781-794.

**O'Rourke, N.A., Chenn, A., and McConnell, S.K.** (1997). Postmitotic neurons migrate tangentially in the cortical ventricular zone. *Development* **124**, 997-1005.

**O'Rourke, N.A., Dailey, M.E., Smith, S.J., and McConnell, S.K.** (1992). Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science* **258**, 299-302.

**O'Rourke, N.A., Sullivan, D.P., Kaznowski, C.E., Jacobs, A.A., and McConnell, S.K.** (1995). Tangential migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Development* **121**, 2165-2176.

**Osmani, N., Vitale, N., Borg, J.P., and Etienne-Manneville, S.** (2006). Scrib controls Cdc42 localization and activity to promote cell polarization during astrocyte migration. *Curr Biol* **16**, 2395-2405.

**Otto, E.A., Schermer, B., Obara, T., O'Toole, J.F., Hiller, K.S., Mueller, A.M., Ruf, R.G., Hoefele, J., Beekmann, F., Landau, D., Foreman, J.W., Goodship, J.A., Strachan, T., Kispert, A., Wolf, M.T., Gagnadoux, M.F., Nivet, H., Antignac, C., Walz, G., Drummond, I.A., Benzing, T., and Hildebrandt, F.** (2003). Mutations in INVS encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination. *Nat Genet* **34**, 413-420.

**Paintrand, M., Moudjou, M., Delacroix, H., and Bornens, M.** (1992). Centrosome organization and centriole architecture: their sensitivity to divalent cations. *J Struct Biol* **108**, 107-128.

**Palazzo, A.F., Cook, T.A., Alberts, A.S., and Gundersen, G.G.** (2001). mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol* **3**, 723-729.

**Palazzo, A.F., Eng, C.H., Schlaepfer, D.D., Marcantonio, E.E., and Gundersen, G.G.** (2004). Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science* **303**, 836-839.

**Pan, J., and Snell, W.** (2007). The primary cilium: keeper of the key to cell division. *Cell* **129**, 1255-1257.

**Paratcha, G., Ibanez, C.F., and Ledda, F.** (2006). GDNF is a chemoattractant factor for neuronal precursor cells in the rostral migratory stream. *Mol Cell Neurosci* **31**, 505-514.

**Park, T.J., Haigo, S.L., and Wallingford, J.B.** (2006). Ciliogenesis defects in embryos lacking inturned or fuzzy function are associated with failure of planar cell polarity and Hedgehog signaling. *Nat Genet* **38**, 303-311.

**Parnavelas, J.G., Anderson, S.A., Lavdas, A.A., Grigoriou, M., Pachnis, V., and Rubenstein, J.L.** (2000). The contribution of the ganglionic eminence to the neuronal cell types of the cerebral cortex. *Novartis Found Symp* **228**, 129-139; discussion 139-147.

**Paschal, B.M., Mikami, A., Pfister, K.K., and Vallee, R.B.** (1992). Homology of the 74-kD cytoplasmic dynein subunit with a flagellar dynein polypeptide suggests an intracellular targeting function. *J Cell Biol* **118**, 1133-1143.

**Paschal, B.M., King, S.M., Moss, A.G., Collins, C.A., Vallee, R.B., and Witman, G.B.** (1987). Isolated flagellar outer arm dynein translocates brain microtubules in vitro. *Nature* **330**, 672-674.

**Paturle-Lafanechere, L., Manier, M., Trigault, N., Pirolet, F., Mazarguil, H., and Job, D.** (1994). Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J Cell Sci* **107** ( Pt 6), 1529-1543.

**Paturle-Lafanechere, L., Edde, B., Denoulet, P., Van Dorsselaer, A., Mazarguil, H., Le Caer, J.P., Wehland, J., and Job, D.** (1991). Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochemistry* **30**, 10523-10528.

**Paudel, H.K., Lew, J., Ali, Z., and Wang, J.H.** (1993). Brain proline-directed protein kinase phosphorylates tau on sites that are abnormally phosphorylated in tau associated with Alzheimer's paired helical filaments. *J Biol Chem* **268**, 23512-23518.

**Pazour, G.J., Dickert, B.L., Vucica, Y., Seeley, E.S., Rosenbaum, J.L., Witman, G.B., and Cole, D.G.** (2000). Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene *tg737*, are required for assembly of cilia and flagella. *J Cell Biol* **151**, 709-718.

**Pazour, G.J., Baker, S.A., Deane, J.A., Cole, D.G., Dickert, B.L., Rosenbaum, J.L., Witman, G.B., and Besharse, J.C.** (2002). The intraflagellar transport protein, IFT88, is essential for vertebrate photoreceptor assembly and maintenance. *J Cell Biol* **157**, 103-113.

**Peris, L., Thery, M., Faure, J., Saoudi, Y., Lafanechere, L., Chilton, J.K., Gordon-Weeks, P., Galjart, N., Bornens, M., Wordeman, L., Wehland, J., Andrieux, A., and Job, D.** (2006). Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J Cell Biol* **174**, 839-849.

**Peters, A.P., SL. Webster, HD.** (1976). The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells.

- Pettit, E.J., and Fay, F.S.** (1998). Cytosolic free calcium and the cytoskeleton in the control of leukocyte chemotaxis. *Physiol Rev* **78**, 949-967.
- Piel, M., Meyer, P., Khodjakov, A., Rieder, C.L., and Bornens, M.** (2000). The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *J Cell Biol* **149**, 317-330.
- Pilz, D.T., Kuc, J., Matsumoto, N., Bodurtha, J., Bernadi, B., Tassinari, C.A., Dobyns, W.B., and Ledbetter, D.H.** (1999). Subcortical band heterotopia in rare affected males can be caused by missense mutations in DCX (XLIS) or LIS1. *Hum Mol Genet* **8**, 1757-1760.
- Pinard, J.M., Motte, J., Chiron, C., Brian, R., Andermann, E., and Dulac, O.** (1994). Subcortical laminar heterotopia and lissencephaly in two families: a single X linked dominant gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **57**, 914-920.
- Pinto-Lord, M.C., Evrard, P., and Caviness, V.S., Jr.** (1982). Obstructed neuronal migration along radial glial fibers in the neocortex of the reeler mouse: a Golgi-EM analysis. *Brain Res* **256**, 379-393.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G.** (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453-465.
- Polleux, F., Whitford, K.L., Dijkhuizen, P.A., Vitalis, T., and Ghosh, A.** (2002). Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development* **129**, 3147-3160.
- Poluch, S., and Juliano, S.L.** (2007). A normal radial glial scaffold is necessary for migration of interneurons during neocortical development. *Glia* **55**, 822-830.
- Pontious, A., Kowalczyk, T., Englund, C., and Hevner, R.F.** (2008). Role of intermediate progenitor cells in cerebral cortex development. *Dev Neurosci* **30**, 24-32.
- Powell, E.M., Mars, W.M., and Levitt, P.** (2001). Hepatocyte growth factor/scatter factor is a motogen for interneurons migrating from the ventral to dorsal telencephalon. *Neuron* **30**, 79-89.
- Pozas, E., and Ibanez, C.F.** (2005). GDNF and GFRalpha1 promote differentiation and tangential migration of cortical GABAergic neurons. *Neuron* **45**, 701-713.
- Praetorius, H.A., and Spring, K.R.** (2001). Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium. *J Membr Biol* **184**, 71-79.
- Praetorius, H.A., and Spring, K.R.** (2003). The renal cell primary cilium functions as a flow sensor. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **12**, 517-520.
- Pramatarova, A., Ochalski, P.G., Lee, C.H., and Howell, B.W.** (2006). Mouse disabled 1 regulates the nuclear position of neurons in a Drosophila eye model. *Mol Cell Biol* **26**, 1510-1517.
- Prigozhina, N.L., and Waterman-Storer, C.M.** (2004). Protein kinase D-mediated anterograde membrane trafficking is required for fibroblast motility. *Curr Biol* **14**, 88-98.
- Pugacheva, E.N., Jablonski, S.A., Hartman, T.R., Henske, E.P., and Golemis, E.A.** (2007). HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell* **129**, 1351-1363.
- Purves, D., Fitzpatrick, D., Williams, M.S., McNamara, J.O., Augustine, G.J., Katz, L.C., and LaMantia, A.S.** Neuroscience. **Sinauer Edition. 2nd Edition.**
- Raftopoulou, M., and Hall, A.** (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* **265**, 23-32.
- Raftopoulou, M., and Hall, A.** (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* **265**, 23-32.
- Ragsdale, C.W., and Grove, E.A.** (2001). Patterning the mammalian cerebral cortex. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 50-58.
- Rai, S.S., and Wolff, J.** (1998). The C terminus of beta-tubulin regulates vinblastine-induced tubulin polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4253-4257.
- Raisman, G., Lawrence, J.M., and Brook, G.A.** (1993). Schwann cells transplanted into the CNS. *Int. J. Dev. Neurosci.* **11**, 651-669.
- Rakic, P.** (1971). Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *J Comp Neurol* **141**, 283-312.
- Rakic, P.** (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* **145**, 61-83.
- Rakic, P.** (1974). Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* **183**, 425-427.
- Rakic, P.** (1978). Neuronal migration and contact guidance in the primate telencephalon. *Postgrad Med J* **54 Suppl 1**, 25-40.
- Rakic, P.** (1988). Specification of cerebral cortical areas. *Science* **241**, 170-176.
- Rakic, P.** (1995). Radial versus tangential migration of neuronal clones in the developing cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11323-11327.
- Rakic, S., and Zecevic, N.** (2000). Programmed cell death in the developing human telencephalon. *Eur J Neurosci* **12**, 2721-2734.
- Rakic, S., and Zecevic, N.** (2003). Emerging complexity of layer I in human cerebral cortex. *Cereb Cortex* **13**, 1072-1083.

**Rakic, P., Knyihar-Csillik, E., and Csillik, B.** (1996). Polarity of microtubule assemblies during neuronal cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9218-9222.

**Reed, N.A., Cai, D., Blasius, T.L., Jih, G.T., Meyhofer, E., Gaertig, J., and Verhey, K.J.** (2006). Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol* **16**, 2166-2172.

**Regnard, C., Desbruyeres, E., Denoulet, P., and Edde, B.** (1999). Tubulin polyglutamylase: isozymic variants and regulation during the cell cycle in HeLa cells. *J Cell Sci* **112** ( Pt **23**), 4281-4289.

**Reilein, A., and Nelson, W.J.** (2005). APC is a component of an organizing template for cortical microtubule networks. *Nat Cell Biol* **7**, 463-473.

**Reiner, O., and Sapir, T.** (2006). Cdk5 checks p27kip1 in neuronal migration. *Nat Cell Biol* **8**, 11-13.

**Reiner, O., Carrozzo, R., Shen, Y., Wehnert, M., Faustinella, F., Dobyns, W.B., Caskey, C.T., and Ledbetter, D.H.** (1993). Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature* **364**, 717-721.

**Reiner, O., Albrecht, U., Gordon, M., Chianese, K.A., Wong, C., Gal-Gerber, O., Sapir, T., Siracusa, L.D., Buchberg, A.M., Caskey, C.T., and et al.** (1995). Lissencephaly gene (LIS1) expression in the CNS suggests a role in neuronal migration. *J Neurosci* **15**, 3730-3738.

**Reinsch, S., and Karsenti, E.** (1997). Movement of nuclei along microtubules in *Xenopus* egg extracts. *Curr Biol* **7**, 211-214.

**Reinsch, S., and Gonczy, P.** (1998). Mechanisms of nuclear positioning. *J Cell Sci* **111** ( Pt **16**), 2283-2295.

**Rice, D.S., and Curran, T.** (2001). Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci* **24**, 1005-1039.

**Ridley, A.J.** (2001). Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol* **11**, 471-477.

**Ridley, A.J., and Hall, A.** (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-399.

**Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R.** (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**, 1704-1709.

**Rieder, C.L., Jensen, C.G., and Jensen, L.C.** (1979). The resorption of primary cilia during mitosis in a vertebrate (PtK1) cell line. *J Ultrastruct Res* **68**, 173-185.

**Rieder, C.L., Faruki, S., and Khodjakov, A.** (2001). The centrosome in vertebrates: more than a microtubule-organizing center. *Trends Cell Biol* **11**, 413-419.

**Rios, R.M., and Bornens, M.** (2003). The Golgi apparatus at the cell centre. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 60-66.

**Rivas, R.J., and Hatten, M.E.** (1995). Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *J Neurosci* **15**, 981-989.

**Robert, A., Margall-Ducos, G., Guidotti, J.E., Bregerie, O., Celati, C., Brechot, C., and Desdouets, C.** (2007). The intraflagellar transport component IFT88/polaris is a centrosomal protein regulating G1-S transition in non-ciliated cells. *J Cell Sci* **120**, 628-637.

**Roberts, M.R., Bittman, K., Li, W.W., French, R., Mitchell, B., LoTurco, J.J., and D'Mello, S.R.** (2000). The flathead mutation causes CNS-specific developmental abnormalities and apoptosis. *J Neurosci* **20**, 2295-2306.

**Roh, M.H., Fan, S., Liu, C.J., and Margolis, B.** (2003). The Crumbs3-Pals1 complex participates in the establishment of polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Sci* **116**, 2895-2906.

**Rohatgi, R., Ho, H.Y., and Kirschner, M.W.** (2000). Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol* **150**, 1299-1310.

**Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D., and Carlier, M.F.** (2004). Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell* **119**, 419-429.

**Rosales, J.L., Lee, B.C., Modarressi, M., Sarker, K.P., Lee, K.Y., Jeong, Y.G., and Oko, R.** (2004). Outer dense fibers serve as a functional target for Cdk5.p35 in the developing sperm tail. *J Biol Chem* **279**, 1224-1232.

**Rosen, G.D., Bai, J., Wang, Y., Fiondella, C.G., Threlkeld, S.W., LoTurco, J.J., and Galaburda, A.M.** (2007). Disruption of neuronal migration by RNAi of *Dyx1c1* results in neocortical and hippocampal malformations. *Cereb Cortex* **17**, 2562-2572.

**Ruela, C.T., MA. Paula-Barbosa, MM.** (1981). Cilia in stellate neurons of the rat cerebellum. *Experientia* **37**, 197-198.

**Ruiz i Altaba, A.** (1998). Neural patterning. Deconstructing the organizer. *Nature* **391**, 748-749.

**Ruiz i Altaba, A.** (1999). The works of GLI and the power of hedgehog. *Nat Cell Biol* **1**, E147-148.

**Ruiz i Altaba, A., Palma, V., and Dahmane, N.** (2002). Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci* **3**, 24-33.

**Saha, K., and Schaffer, D.V.** (2006). Signal dynamics in Sonic hedgehog tissue patterning. *Development* **133**, 889-900.

**Salina, D., Bodoor, K., Eckley, D.M., Schroer, T.A., Rattner, J.B., and Burke, B.** (2002). Cytoplasmic dynein as a facilitator of nuclear envelope breakdown. *Cell* **108**, 97-107.



**Salmon, W.C., Adams, M.C., and Waterman-Storer, C.M.** (2002). Dual-wavelength fluorescent speckle microscopy reveals coupling of microtubule and actin movements in migrating cells. *J Cell Biol* **158**, 31-37.

**Sanada, K., Gupta, A., and Tsai, L.H.** (2004). Disabled-1-regulated adhesion of migrating neurons to radial glial fiber contributes to neuronal positioning during early corticogenesis. *Neuron* **42**, 197-211.

**Sander, E.E., ten Klooster, J.P., van Delft, S., van der Kammen, R.A., and Collard, J.G.** (1999). Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* **147**, 1009-1022.

**Sander, M., Paydar, S., Ericson, J., Briscoe, J., Berber, E., German, M., Jessell, T.M., and Rubenstein, J.L.** (2000). Ventral neural patterning by Nkx homeobox genes: Nkx6.1 controls somatic motor neuron and ventral interneuron fates. *Genes Dev* **14**, 2134-2139.

**Sandquist, J.C., Swenson, K.I., Demali, K.A., Burrige, K., and Means, A.R.** (2006). Rho kinase differentially regulates phosphorylation of nonmuscle myosin II isoforms A and B during cell rounding and migration. *J Biol Chem* **281**, 35873-35883.

**Sapir, T., Elbaum, M., and Reiner, O.** (1997). Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *Embo J* **16**, 6977-6984.

**Sapir, T., Cahana, A., Seger, R., Nekhai, S., and Reiner, O.** (1999). LIS1 is a microtubule-associated phosphoprotein. *Eur J Biochem* **265**, 181-188.

**Sarkisian, M.R., Frenkel, M., Li, W., Oborski, J.A., and LoTurco, J.J.** (2001). Altered interneuron development in the cerebral cortex of the flathead mutant. *Cereb Cortex* **11**, 734-743.

**Sarkisian, M.R., Bartley, C.M., Chi, H., Nakamura, F., Hashimoto-Torii, K., Torii, M., Flavell, R.A., and Rakic, P.** (2006). MEKK4 signaling regulates filamin expression and neuronal migration. *Neuron* **52**, 789-801.

**Sasaki, S., Mori, D., Toyo-oka, K., Chen, A., Garrett-Beal, L., Muramatsu, M., Miyagawa, S., Hiraiwa, N., Yoshiki, A., Wynshaw-Boris, A., and Hirotsune, S.** (2005). Complete loss of Ndel1 results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Mol Cell Biol* **25**, 7812-7827.

**Satir, P., and Christensen, S.T.** (2007). Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu Rev Physiol* **69**, 377-400.

**Sauer, F.** (1935). Mitosis in the neural tube. *J Comp Neurol* **62**, 377-405.

**Sawamoto, K., Wichterle, H., Gonzalez-Perez, O., Cholfin, J.A., Yamada, M., Spassky, N., Murcia, N.S., Garcia-Verdugo, J.M., Marin, O., Rubenstein, J.L., Tessier-Lavigne, M., Okano, H., and Alvarez-Buylla, A.** (2006). New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* **311**, 629-632.

**Sayas, C.L., Avila, J., and Wandosell, F.** (2002). Glycogen synthase kinase-3 is activated in neuronal cells by Galpha12 and Galpha13 by Rho-independent and Rho-dependent mechanisms. *J Neurosci* **22**, 6863-6875.

**Sayer, J.A., Otto, E.A., O'Toole, J.F., Nurnberg, G., Kennedy, M.A., Becker, C., Hennies, H.C., Helou, J., Attanasio, M., Fausett, B.V., Utsch, B., Khanna, H., Liu, Y., Drummond, I., Kawakami, I., Kusakabe, T., Tsuda, M., Ma, L., Lee, H., Larson, R.G., Allen, S.J., Wilkinson, C.J., Nigg, E.A., Shou, C., Lillo, C., Williams, D.S., Hoppe, B., Kemper, M.J., Neuhaus, T., Parisi, M.A., Glass, I.A., Petry, M., Kispert, A., Gloy, J., Ganner, A., Walz, G., Zhu, X., Goldman, D., Nurnberg, P., Swaroop, A., Leroux, M.R., and Hildebrandt, F.** (2006). The centrosomal protein nephrocystin-6 is mutated in Joubert syndrome and activates transcription factor ATF4. *Nat Genet* **38**, 674-681.

**Schaar, B.T., and McConnell, S.K.** (2005). Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13652-13657.

**Schaar, B.T., Kinoshita, K., and McConnell, S.K.** (2004). Doublecortin microtubule affinity is regulated by a balance of kinase and phosphatase activity at the leading edge of migrating neurons. *Neuron* **41**, 203-213.

**Schiff, P.B., Fant, J., and Horwitz, S.B.** (1979). Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* **277**, 665-667.

**Schliwa, M., and Woehlke, G.** (2003). Molecular motors. *Nature* **422**, 759-765.

**Schmechel, D.E., and Rakic, P.** (1979). A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat Embryol (Berl)* **156**, 115-152.

**Schmitz, A.A., Govek, E.E., Bottner, B., and Van Aelst, L.** (2000). Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res* **261**, 1-12.

**Scholey, J.M., and Anderson, K.V.** (2006). Intraflagellar transport and cilium-based signaling. *Cell* **125**, 439-442.

**Scholey, J.M., Taylor, K.A., and Kendrick-Jones, J.** (1980). Regulation of non-muscle myosin assembly by calmodulin-dependent light chain kinase. *Nature* **287**, 233-235.

**Schulz, S., Handel, M., Schreff, M., Schmidt, H., and Holtt, V.** (2000). Localization of five somatostatin receptors in the rat central nervous system using subtype-specific antibodies. *J Physiol Paris* **94**, 259-264.

**Schuermans, C., and Guillemot, F.** (2002). Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Curr Opin Neurobiol* **12**, 26-34.

**Schuyler, S.C., and Pellman, D.** (2001). Microtubule "plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning. *Cell* **105**, 421-424.

- Schwartz, E.A., Leonard, M.L., Bizios, R., and Bowser, S.S.** (1997). Analysis and modeling of the primary cilium bending response to fluid shear. *Am J Physiol* **272**, F132-138.
- Schwarz, Q., Gu, C., Fujisawa, H., Sabelko, K., Gertsenstein, M., Nagy, A., Taniguchi, M., Kolodkin, A.L., Ginty, D.D., Shima, D.T., and Ruhrberg, C.** (2004). Vascular endothelial growth factor controls neuronal migration and cooperates with *Sema3A* to pattern distinct compartments of the facial nerve. *Genes Dev* **18**, 2822-2834.
- Sellers, J.R.** (1999). Unphosphorylated crossbridges and latch: smooth muscle regulation revisited. *J Muscle Res Cell Motil* **20**, 347-349.
- Sellers, J.R.** (2000). Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* **1496**, 3-22.
- Sheen, V.L., and Walsh, C.A.** (2003). Developmental genetic malformations of the cerebral cortex. *Curr Neurol Neurosci Rep* **3**, 433-441.
- Sheen, V.L., Ganesh, V.S., Topcu, M., Sebire, G., Bodell, A., Hill, R.S., Grant, P.E., Shugart, Y.Y., Imitola, J., Khoury, S.J., Guerrini, R., and Walsh, C.A.** (2004). Mutations in *ARFGEF2* implicate vesicle trafficking in neural progenitor proliferation and migration in the human cerebral cortex. *Nat Genet* **36**, 69-76.
- Sheen, V.L., Dixon, P.H., Fox, J.W., Hong, S.E., Kinton, L., Sisodiya, S.M., Duncan, J.S., Dubeau, F., Scheffer, I.E., Schachter, S.C., Wilner, A., Henchy, R., Crino, P., Kamuro, K., DiMario, F., Berg, M., Kuzniecky, R., Cole, A.J., Bromfield, E., Biber, M., Schomer, D., Wheless, J., Silver, K., Mochida, G.H., Berkovic, S.F., Andermann, F., Andermann, E., Dobyns, W.B., Wood, N.W., and Walsh, C.A.** (2001). Mutations in the X-linked *filamin 1* gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females. *Hum Mol Genet* **10**, 1775-1783.
- Shi, S.H., Jan, L.Y., and Jan, Y.N.** (2003). Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized *mPar3/mPar6* and PI 3-kinase activity. *Cell* **112**, 63-75.
- Shimamura, K., and Rubenstein, J.L.** (1997). Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* **124**, 2709-2718.
- Shu, T., Ayala, R., Nguyen, M.D., Xie, Z., Gleeson, J.G., and Tsai, L.H.** (2004). *Ndel1* operates in a common pathway with *LIS1* and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning. *Neuron* **44**, 263-277.
- Siddique, M.S., Mogami, G., Miyazaki, T., Katayama, E., Uyeda, T.Q., and Suzuki, M.** (2005). Cooperative structural change of actin filaments interacting with activated myosin motor domain, detected with copolymers of pyrene-labeled actin and acto-S1 chimera protein. *Biochem Biophys Res Commun* **337**, 1185-1191.
- Siksoo, L., Rostaing, P., Lechaire, J.P., Boudier, T., Ohtsuka, T., Fejtova, A., Kao, H.T., Greengard, P., Gundelfinger, E.D., Triller, A., and Marty, S.** (2007). Three-dimensional architecture of presynaptic terminal cytomatrix. *J Neurosci* **27**, 6868-6877.
- Simons, M., Gloy, J., Ganner, A., Bullerkotte, A., Bashkurov, M., Kronig, C., Schermer, B., Benzing, T., Cabello, O.A., Jenny, A., Mlodzik, M., Polok, B., Driever, W., Obara, T., and Walz, G.** (2005). *Inversin*, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat Genet* **37**, 537-543.
- Singer, S.J., and Kupfer, A.** (1986). The directed migration of eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Biol* **2**, 337-365.
- Sluder, G.** (2005). Two-way traffic: centrosomes and the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 743-748.
- Small, J.V., Herzog, M., Haner, M., and Abei, U.** (1994). Visualization of actin filaments in keratocyte lamellipodia: negative staining compared with freeze-drying. *J Struct Biol* **113**, 135-141.
- Smart, I.H.** (1973). Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the mouse neocortex: a pilot study based on recording the number, location and plane of cleavage of mitotic figures. *J Anat* **116**, 67-91.
- Smart, I.H., and Smart, M.** (1977). The location of nuclei of different labelling intensities in autoradiographs of the anterior forebrain of postnatal mice injected with [<sup>3</sup>H]thymidine on the eleventh and twelfth days post-conception. *J Anat* **123**, 515-525.
- Smart, I.H., and McSherry, G.M.** (1982). Growth patterns in the lateral wall of the mouse telencephalon. II. Histological changes during and subsequent to the period of isocortical neuron production. *J Anat* **134**, 415-442.
- Smith, D., Wagner, E., Koul, O., McCaffery, P., and Drager, U.C.** (2001). Retinoic acid synthesis for the developing telencephalon. *Cereb Cortex* **11**, 894-905.
- Smith, D.S., Niethammer, M., Ayala, R., Zhou, Y., Gambello, M.J., Wynshaw-Boris, A., and Tsai, L.H.** (2000). Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian *Lis1*. *Nat Cell Biol* **2**, 767-775.
- Smith, U.M., Consugar, M., Tee, L.J., McKee, B.M., Maina, E.N., Whelan, S., Morgan, N.V., Goranson, E., Gissen, P., Lilliquist, S., Aligianis, I.A., Ward, C.J., Pasha, S., Punyashthiti, R., Malik Sharif, S., Batman, P.A., Bennett, C.P., Woods, C.G., McKeown, C., Bucourt, M., Miller, C.A., Cox, P., Algazali, L., Trembath, R.C., Torres, V.E., Attie-Bitach, T., Kelly, D.A., Maher, E.R., Gattone, V.H., 2nd, Harris, P.C., and Johnson, C.A.** (2006). The transmembrane protein meckelin (*MKS3*) is mutated in Meckel-Gruber syndrome and the *wpk* rat. *Nat Genet* **38**, 191-196.

**Solecki, D.J., Model, L., Gaetz, J., Kapoor, T.M., and Hatten, M.E.** (2004). Par6alpha signaling controls glial-guided neuronal migration. *Nat Neurosci* **7**, 1195-1203.

**Somlyo, A.P., and Somlyo, A.V.** (2003). Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* **83**, 1325-1358.

**Somlyo, A.P., and Somlyo, A.V.** (2004). Signal transduction through the RhoA/Rho-kinase pathway in smooth muscle. *J Muscle Res Cell Motil* **25**, 613-615.

**Soria, J.M., and Valdeolmillos, M.** (2002). Receptor-activated calcium signals in tangentially migrating cortical cells. *Cereb Cortex* **12**, 831-839.

**Soriano, E., and Del Rio, J.A.** (2005). The cells of cajal-retzius: still a mystery one century after. *Neuron* **46**, 389-394.

**Sorokin, S.** (1962). Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *J Cell Biol* **15**, 363-377.

**Spudich, J.A.** (2001). The myosin swinging cross-bridge model. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 387-392.

**Steffen, W., Karki, S., Vaughan, K.T., Vallee, R.B., Holzbaur, E.L., Weiss, D.G., and Kuznetsov, S.A.** (1997). The involvement of the intermediate chain of cytoplasmic dynein in binding the motor complex to membranous organelles of *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell* **8**, 2077-2088.

**Stepanyan, Z., Kocharyan, A., Pyrski, M., Hubschle, T., Watson, A.M., Schulz, S., and Meyerhof, W.** (2003). Leptin-target neurons of the rat hypothalamus express somatostatin receptors. *J Neuroendocrinol* **15**, 822-830.

**Stoykova, A., Treichel, D., Hallonet, M., and Gruss, P.** (2000). Pax6 modulates the dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *J Neurosci* **20**, 8042-8050.

**Stuhmer, T., Puelles, L., Ekker, M., and Rubenstein, J.L.** (2002). Expression from a Dlx gene enhancer marks adult mouse cortical GABAergic neurons. *Cereb Cortex* **12**, 75-85.

**Stumm, R.K., Zhou, C., Ara, T., Lazarini, F., Dubois-Dalcq, M., Nagasawa, T., Holtt, V., and Schulz, S.** (2003). CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *J Neurosci* **23**, 5123-5130.

**Sumi, T., Matsumoto, K., and Nakamura, T.** (2001). Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **276**, 670-676.

**Super, H., Soriano, E., and Uylings, H.B.** (1998). The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. *Brain Res Brain Res Rev* **27**, 40-64.

**Sussel, L., Marin, O., Kimura, S., and Rubenstein, J.L.** (1999). Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* **126**, 3359-3370.

**Suzuki, A., and Ohno, S.** (2006). The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J Cell Sci* **119**, 979-987.

**Tabata, H., and Nakajima, K.** (2003). Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* **23**, 9996-10001.

**Taghialatela, P., Soria, J.M., Caironi, V., Moiana, A., and Bertuzzi, S.** (2004). Compromised generation of GABAergic interneurons in the brains of *Vax1*<sup>-/-</sup> mice. *Development* **131**, 4239-4249.

**Taipale, M., Kaminen, N., Nopola-Hemmi, J., Haltia, T., Myllyluoma, B., Lyytinen, H., Muller, K., Kaaranen, M., Lindsberg, P.J., Hannula-Jouppi, K., and Kere, J.** (2003). A candidate gene for developmental dyslexia encodes a nuclear tetratricopeptide repeat domain protein dynamically regulated in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11553-11558.

**Takahashi, T., Nowakowski, R.S., and Caviness, V.S., Jr.** (1993). Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neocortical proliferative zone of the fetal mouse. *J Neurosci* **13**, 820-833.

**Takahashi, T., Nowakowski, R.S., and Caviness, V.S., Jr.** (1996). Interkinetic and migratory behavior of a cohort of neocortical neurons arising in the early embryonic murine cerebral wall. *J Neurosci* **16**, 5762-5776.

**Takenawa, T., and Miki, H.** (2001). WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci* **114**, 1801-1809.

**Takiguchi-Hayashi, K., Sekiguchi, M., Ashigaki, S., Takamatsu, M., Hasegawa, H., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Nakanishi, S., and Tanabe, Y.** (2004). Generation of reelin-positive marginal zone cells from the caudomedial wall of telencephalic vesicles. *J Neurosci* **24**, 2286-2295.

**Tamai, H., Shinohara, H., Miyata, T., Saito, K., Nishizawa, Y., Nomura, T., and Osumi, N.** (2007). Pax6 transcription factor is required for the interkinetic nuclear movement of neuroepithelial cells. *Genes Cells* **12**, 983-996.

**Tamamaki, N., Fujimori, K.E., and Takauji, R.** (1997). Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J Neurosci* **17**, 8313-8323.

**Tamamaki, N., Nakamura, K., Okamoto, K., and Kaneko, T.** (2001). Radial glia is a progenitor of neocortical neurons in the developing cerebral cortex. *Neurosci Res* **41**, 51-60.

**Tamm, S.L., and Tamm, S.** (1988). Development of macrociliary cells in *Beroë*. II. Formation of macrocilia. *J Cell Sci* **89** ( Pt 1), 81-95.

- Tan, S.S., and Breen, S.** (1993). Radial mosaicism and tangential cell dispersion both contribute to mouse neocortical development. *Nature* **362**, 638-640.
- Tan, S.S., Faulkner-Jones, B., Breen, S.J., Walsh, M., Bertram, J.F., and Reese, B.E.** (1995). Cell dispersion patterns in different cortical regions studied with an X-inactivated transgenic marker. *Development* **121**, 1029-1039.
- Tanaka, D., Nakaya, Y., Yanagawa, Y., Obata, K., and Murakami, F.** (2003). Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins. *Development* **130**, 5803-5813.
- Tanaka, T., Serneo, F.F., Higgins, C., Gambello, M.J., Wynshaw-Boris, A., and Gleeson, J.G.** (2004). Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *J Cell Biol* **165**, 709-721.
- Tanaka, T., Serneo, F.F., Tseng, H.C., Kulkarni, A.B., Tsai, L.H., and Gleeson, J.G.** (2004). Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron* **41**, 215-227.
- Tang, D., Yeung, J., Lee, K.Y., Matsushita, M., Matsui, H., Tomizawa, K., Hatase, O., and Wang, J.H.** (1995). An isoform of the neuronal cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activator. *J Biol Chem* **270**, 26897-26903.
- Taulman, P.D., Haycraft, C.J., Balkovetz, D.F., and Yoder, B.K.** (2001). Polaris, a protein involved in left-right axis patterning, localizes to basal bodies and cilia. *Mol Biol Cell* **12**, 589-599.
- te Welscher, P., Zuniga, A., Kuijper, S., Drenth, T., Goedemans, H.J., Meijlink, F., and Zeller, R.** (2002). Progression of vertebrate limb development through SHH-mediated counteraction of GLI3. *Science* **298**, 827-830.
- Testaz, S., Jarov, A., Williams, K.P., Ling, L.E., Koteliensky, V.E., Fournier-Thibault, C., and Duband, J.L.** (2001). Sonic hedgehog restricts adhesion and migration of neural crest cells independently of the Patched-Smoothed-Gli signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12521-12526.
- Tham, T.N., Lazarini, F., Franceschini, I.A., Lachapelle, F., Amara, A., and Dubois-Dalcq, M.** (2001). Developmental pattern of expression of the alpha chemokine stromal cell-derived factor 1 in the rat central nervous system. *Eur J Neurosci* **13**, 845-856.
- Thauvin-Robinet, C., Cossec, M., Cormier-Daire, V., Van Maldergem, L., Toutain, A., Alembik, Y., Bieth, E., Layet, V., Parent, P., David, A., Goldenberg, A., Mortier, G., Heron, D., Sagot, P., Bouvier, A.M., Huet, F., Cusin, V., Donzel, A., Devys, D., Teyssier, J.R., and Faivre, L.** (2006). Clinical, molecular, and genotype-phenotype correlation studies from 25 cases of oral-facial-digital syndrome type 1: a French and Belgian collaborative study. *J Med Genet* **43**, 54-61.
- Thazhath, R., Liu, C., and Gaertig, J.** (2002). Polyglycylation domain of beta-tubulin maintains axonemal architecture and affects cytokinesis in *Tetrahymena*. *Nat Cell Biol* **4**, 256-259.
- Thery, M., Racine, V., Piel, M., Pepin, A., Dimitrov, A., Chen, Y., Sibarita, J.B., and Bornens, M.** (2006). Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19771-19776.
- Thom, M., Martinian, L., Parnavelas, J.G., and Sisodiya, S.M.** (2004). Distribution of cortical interneurons in grey matter heterotopia in patients with epilepsy. *Epilepsia* **45**, 916-923.
- Thored, P., Wood, J., Arvidsson, A., Cammenga, J., Kokaia, Z., and Lindvall, O.** (2007). Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke* **38**, 3032-3039.
- Threlkeld, S.W., McClure, M.M., Bai, J., Wang, Y., LoTurco, J.J., Rosen, G.D., and Fitch, R.H.** (2007). Developmental disruptions and behavioral impairments in rats following in utero RNAi of *Dyx1c1*. *Brain Res Bull* **71**, 508-514.
- Tissir, F., and Goffinet, A.M.** (2003). Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci* **4**, 496-505.
- Tiveron, M.C., Rossel, M., Moepps, B., Zhang, Y.L., Seidenfaden, R., Favor, J., Konig, N., and Cremer, H.** (2006). Molecular interaction between projection neuron precursors and invading interneurons via stromal-derived factor 1 (CXCL12)/CXCR4 signaling in the cortical subventricular zone/intermediate zone. *J Neurosci* **26**, 13273-13278.
- Tobin, D., Madsen, D., Kahn-Kirby, A., Peckol, E., Moulder, G., Barstead, R., Maricq, A., and Bargmann, C.** (2002). Combinatorial expression of TRPV channel proteins defines their sensory functions and subcellular localization in *C. elegans* neurons. *Neuron* **35**, 307-318.
- Tole, S., Ragsdale, C.W., and Grove, E.A.** (2000). Dorsoventral patterning of the telencephalon is disrupted in the mouse mutant *extra-toes(J)*. *Dev Biol* **217**, 254-265.
- Torban, E., Kor, C., and Gros, P.** (2004). Van Gogh-like2 (*Strabismus*) and its role in planar cell polarity and convergent extension in vertebrates. *Trends Genet* **20**, 570-577.
- Toresson, H., Potter, S.S., and Campbell, K.** (2000). Genetic control of dorsal-ventral identity in the telencephalon: opposing roles for *Pax6* and *Gsh2*. *Development* **127**, 4361-4371.

- Totsukawa, G., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Hartshorne, D.J., Sasaki, Y., and Matsumura, F.** (2000). Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* **150**, 797-806.
- Totsukawa, G., Wu, Y., Sasaki, Y., Hartshorne, D.J., Yamakita, Y., Yamashiro, S., and Matsumura, F.** (2004). Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J Cell Biol* **164**, 427-439.
- Toyo-Oka, K., Sasaki, S., Yano, Y., Mori, D., Kobayashi, T., Toyoshima, Y.Y., Tokuoka, S.M., Ishii, S., Shimizu, T., Muramatsu, M., Hiraiwa, N., Yoshiki, A., Wynshaw-Boris, A., and Hirotsune, S.** (2005). Recruitment of katanin p60 by phosphorylated NDEL1, an LIS1 interacting protein, is essential for mitotic cell division and neuronal migration. *Hum Mol Genet* **14**, 3113-3128.
- Tsai, L.H., and Gleeson, J.G.** (2005). Nucleokinesis in neuronal migration. *Neuron* **46**, 383-388.
- Tsai, J.W., Bremner, K.H., and Vallee, R.B.** (2007). Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue. *Nat Neurosci* **10**, 970-979.
- Tsai, L.H., Takahashi, T., Caviness, V.S., Jr., and Harlow, E.** (1993). Activity and expression pattern of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system. *Development* **119**, 1029-1040.
- Tsai, J.W., Chen, Y., Kriegstein, A.R., and Vallee, R.B.** (2005). LIS1 RNA interference blocks neural stem cell division, morphogenesis, and motility at multiple stages. *J Cell Biol* **170**, 935-945.
- Tsukada, M., Prokscha, A., Oldekamp, J., and Eichele, G.** (2003). Identification of neurabin II as a novel doublecortin interacting protein. *Mech Dev* **120**, 1033-1043.
- Tsukada, M., Prokscha, A., Ungewickell, E., and Eichele, G.** (2005). Doublecortin association with actin filaments is regulated by neurabin II. *J Biol Chem* **280**, 11361-11368.
- Tucker, R.W., Pardee, A.B., and Fujiwara, K.** (1979). Centriole ciliation is related to quiescence and DNA synthesis in 3T3 cells. *Cell* **17**, 527-535.
- Tucker, R.W., Scher, C.D., and Stiles, C.D.** (1979). Centriole deciliation associated with the early response of 3T3 cells to growth factors but not to SV40. *Cell* **18**, 1065-1072.
- Tullio, A.N., Bridgman, P.C., Tresser, N.J., Chan, C.C., Conti, M.A., Adelstein, R.S., and Hara, Y.** (2001). Structural abnormalities develop in the brain after ablation of the gene encoding nonmuscle myosin II-B heavy chain. *J Comp Neurol* **433**, 62-74.
- Ueda, M., Graf, R., MacWilliams, H.K., Schliwa, M., and Euteneuer, U.** (1997). Centrosome positioning and directionality of cell movements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9674-9678.
- Ueda, H., Morishita, R., Yamauchi, J., Itoh, H., Kato, K., and Asano, T.** (2001). Regulation of Rac and Cdc42 pathways by G(i) during lysophosphatidic acid-induced cell spreading. *J Biol Chem* **276**, 6846-6852.
- Umeshima, H., Hirano, T., and Kengaku, M.** (2007). Microtubule-based nuclear movement occurs independently of centrosome positioning in migrating neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16182-16187.
- Valente, E.M., Silhavy, J.L., Brancati, F., Barrano, G., Krishnaswami, S.R., Castori, M., Lancaster, M.A., Boltshauser, E., Boccone, L., Al-Gazali, L., Fazzi, E., Signorini, S., Louie, C.M., Bellacchio, E., Bertini, E., Dallapiccola, B., and Gleeson, J.G.** (2006). Mutations in CEP290, which encodes a centrosomal protein, cause pleiotropic forms of Joubert syndrome. *Nat Genet* **38**, 623-625.
- Valetti, C., Wetzel, D.M., Schrader, M., Hasbani, M.J., Gill, S.R., Kreis, T.E., and Schroer, T.A.** (1999). Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamitin overexpression and colocalization with CLIP-170. *Mol Biol Cell* **10**, 4107-4120.
- Vallee, R.B., and Stehman, S.A.** (2005). How dynein helps the cell find its center: a servomechanical model. *Trends Cell Biol* **15**, 288-294.
- Vallee, R.B., Wall, J.S., Paschal, B.M., and Shpetner, H.S.** (1988). Microtubule-associated protein 1C from brain is a two-headed cytosolic dynein. *Nature* **332**, 561-563.
- Vasquez, R.J., Howell, B., Yvon, A.M., Wadsworth, P., and Cassimeris, L.** (1997). Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* **8**, 973-985.
- Vicente-Manzanares, M., Webb, D.J., and Horwitz, A.R.** (2005). Cell migration at a glance. *J Cell Sci* **118**, 4917-4919.
- Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L., Choi, C.K., and Horwitz, A.F.** (2007). Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. *J Cell Biol* **176**, 573-580.
- Volkman, N., and Hanein, D.** (2000). Actomyosin: law and order in motility. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 26-34.
- Wald, F.A., Oriolo, A.S., Casanova, M.L., and Salas, P.J.** (2005). Intermediate filaments interact with dormant ezrin in intestinal epithelial cells. *Mol Biol Cell* **16**, 4096-4107.
- Walsh, C., and Cepko, C.L.** (1992). Widespread dispersion of neuronal clones across functional regions of the cerebral cortex. *Science* **255**, 434-440.
- Wang, B., Fallon, J.F., and Beachy, P.A.** (2000). Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* **100**, 423-434.



- Wang, X.J., Tegner, J., Constantinidis, C., and Goldman-Rakic, P.S.** (2004). Division of labor among distinct subtypes of inhibitory neurons in a cortical microcircuit of working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1368-1373.
- Wang, Y., Paramasivam, M., Thomas, A., Bai, J., Kaminen-Ahola, N., Kere, J., Voskuil, J., Rosen, G.D., Galaburda, A.M., and Loturco, J.J.** (2006). DYX1C1 functions in neuronal migration in developing neocortex. *Neuroscience* **143**, 515-522.
- Watanabe, N., and Higashida, C.** (2004). Formins: processive cappers of growing actin filaments. *Exp Cell Res* **301**, 16-22.
- Watanabe, T., Noritake, J., and Kaibuchi, K.** (2005). Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol* **15**, 76-83.
- Watanabe, T., Wang, S., Noritake, J., Sato, K., Fukata, M., Takefuji, M., Nakagawa, M., Izumi, N., Akiyama, T., and Kaibuchi, K.** (2004). Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration. *Dev Cell* **7**, 871-883.
- Weaver, A.M., Young, M.E., Lee, W.L., and Cooper, J.A.** (2003). Integration of signals to the Arp2/3 complex. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 23-30.
- Wei, Q., and Adelstein, R.S.** (2000). Conditional expression of a truncated fragment of nonmuscle myosin II-A alters cell shape but not cytokinesis in HeLa cells. *Mol Biol Cell* **11**, 3617-3627.
- Wen, Y., Eng, C.H., Schmoranzler, J., Cabrera-Poch, N., Morris, E.J., Chen, M., Wallar, B.J., Alberts, A.S., and Gundersen, G.G.** (2004). EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat Cell Biol* **6**, 820-830.
- Wheatley, D.N.** (1971). Cilia in cell-cultured fibroblasts. 3. Relationship between mitotic activity and cilium frequency in mouse 3T6 fibroblasts. *J Anat* **110**, 367-382.
- Wheatley, D.N., Wang, A.M., and Strugnell, G.E.** (1996). Expression of primary cilia in mammalian cells. *Cell Biol Int* **20**, 73-81.
- Whittington, M.A., and Traub, R.D.** (2003). Interneuron diversity series: inhibitory interneurons and network oscillations in vitro. *Trends Neurosci* **26**, 676-682.
- Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J.M., Herrera, D.G., and Alvarez-Buylla, A.** (1999). Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. *Nat Neurosci* **2**, 461-466.
- Wichterle, H., Turnbull, D.H., Nery, S., Fishell, G., and Alvarez-Buylla, A.** (2001). In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* **128**, 3759-3771.
- Williams, J., and O'Donovan, M.C.** (2006). The genetics of developmental dyslexia. *Eur J Hum Genet* **14**, 681-689.
- Wilson, E.** (1911). *The Cell in Development and Inheritance*.
- Wilson, L., Panda, D., and Jordan, M.A.** (1999). Modulation of microtubule dynamics by drugs: a paradigm for the actions of cellular regulators. *Cell Struct Funct* **24**, 329-335.
- Windoffer, R., Kolsch, A., Woll, S., and Leube, R.E.** (2006). Focal adhesions are hotspots for keratin filament precursor formation. *J Cell Biol* **173**, 341-348.
- Wittmann, T., Hyman, A., and Desai, A.** (2001). The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat Cell Biol* **3**, E28-34.
- Wonders, C.P., and Anderson, S.A.** (2006). The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci* **7**, 687-696.
- Wonders, C.P., Taylor, L., Welagen, J., Mbata, I.C., Xiang, J.Z., and Anderson, S.A.** (2007). A spatial bias for the origins of interneuron subgroups within the medial ganglionic eminence. *Dev Biol*.
- Worthylake, R.A., Lemoine, S., Watson, J.M., and Burridge, K.** (2001). RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J Cell Biol* **154**, 147-160.
- Wu, W., Wong, K., Chen, J., Jiang, Z., Dupuis, S., Wu, J.Y., and Rao, Y.** (1999). Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* **400**, 331-336.
- Wylie, S.R., and Chantler, P.D.** (2003). Myosin IIA drives neurite retraction. *Mol Biol Cell* **14**, 4654-4666.
- Wynshaw-Boris, A., and Gambello, M.J.** (2001). LIS1 and dynein motor function in neuronal migration and development. *Genes Dev* **15**, 639-651.
- Xiang, X., Osmani, A.H., Osmani, S.A., Xin, M., and Morris, N.R.** (1995). NudF, a nuclear migration gene in *Aspergillus nidulans*, is similar to the human LIS-1 gene required for neuronal migration. *Mol Biol Cell* **6**, 297-310.
- Xie, Z., Sanada, K., Samuels, B.A., Shih, H., and Tsai, L.H.** (2003). Serine 732 phosphorylation of FAK by Cdk5 is important for microtubule organization, nuclear movement, and neuronal migration. *Cell* **114**, 469-482.
- Xu, Q., Cobos, I., De La Cruz, E., Rubenstein, J.L., and Anderson, S.A.** (2004). Origins of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci* **24**, 2612-2622.
- Xu, Y., Moseley, J.B., Sagot, I., Poy, F., Pellman, D., Goode, B.L., and Eck, M.J.** (2004). Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell* **116**, 711-723.

- Yan, X.X., Zheng, D.S., and Garey, L.J.** (1992). Prenatal development of GABA-immunoreactive neurons in the human striate cortex. *Brain Res Dev Brain Res* **65**, 191-204.
- Yau, H.J., Wang, H.F., Lai, C., and Liu, F.C.** (2003). Neural development of the neuregulin receptor ErbB4 in the cerebral cortex and the hippocampus: preferential expression by interneurons tangentially migrating from the ganglionic eminences. *Cereb Cortex* **13**, 252-264.
- Yokota, Y., Gashghaei, H.T., Han, C., Watson, H., Campbell, K.J., and Anton, E.S.** (2007). Radial glial dependent and independent dynamics of interneuronal migration in the developing cerebral cortex. *PLoS ONE* **2**, e794.
- Young-Pearse, T.L., Bai, J., Chang, R., Zheng, J.B., LoTurco, J.J., and Selkoe, D.J.** (2007). A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *J Neurosci* **27**, 14459-14469.
- Yun, K., Potter, S., and Rubenstein, J.L.** (2001). Gsh2 and Pax6 play complementary roles in dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *Development* **128**, 193-205.
- Yuste, R.** (2005). Origin and classification of neocortical interneurons. *Neuron* **48**, 524-527.
- Zhang, Q., Murcia, N.S., Chittenden, L.R., Richards, W.G., Michaud, E.J., Woychik, R.P., and Yoder, B.K.** (2003). Loss of the Tg737 protein results in skeletal patterning defects. *Dev Dyn* **227**, 78-90.
- Zhao, Z.S., Lim, J.P., Ng, Y.W., Lim, L., and Manser, E.** (2005). The GIT-associated kinase PAK targets to the centrosome and regulates Aurora-A. *Mol Cell* **20**, 237-249.
- Zhen, Y.Y., Libotte, T., Munck, M., Noegel, A.A., and Korenbaum, E.** (2002). NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **115**, 3207-3222.
- Zhu, Y., Li, H., Zhou, L., Wu, J.Y., and Rao, Y.** (1999). Cellular and molecular guidance of GABAergic neuronal migration from an extracortical origin to the neocortex. *Neuron* **23**, 473-485.
- Zigmond, S.H.** (2004). Beginning and ending an actin filament: control at the barbed end. *Curr Top Dev Biol* **63**, 145-188.
- Zigmond, S.H., Levitsky, H.I., and Kreel, B.J.** (1981). Cell polarity: an examination of its behavioral expression and its consequences for polymorphonuclear leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol* **89**, 585-592.
- Zmuda, J.F., and Rivas, R.J.** (1998). The Golgi apparatus and the centrosome are localized to the sites of newly emerging axons in cerebellar granule neurons in vitro. *Cell Motil Cytoskeleton* **41**, 18-38.