



# Physiopathologie des malformations du développement cortical associées à des mutations du gène tubuline $\beta 3$

Yoann Saillour

## ► To cite this version:

Yoann Saillour. Physiopathologie des malformations du développement cortical associées à des mutations du gène tubuline  $\beta 3$ . Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT : 2013PA05T035 . tel-00919773

**HAL Id: tel-00919773**

**<https://theses.hal.science/tel-00919773>**

Submitted on 17 Dec 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 DESCARTES**

Spécialité: **Génétique et Développement**

École Doctorale: génétique, biologie cellulaire, immunologie, infectiologie et développement

Gc2iD

Présentée par

**Yoann SAILLOUR**

En vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Paris Descartes

Titre de la thèse :

**Physiopathologie des Malformations du Développement Cortical  
Associées à des Mutations du Gène Tubuline  $\beta 3$ .**

**Soutenue le mercredi 20 novembre 2013,**

***Devant le Jury composé de:***

Pr Marc Delpech

Pr Hilde Van Esch

Dr Fatiha Nothias

Dr Alfonso Represa

Dr Irina Giurgea

Pr Jamel Chelly

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse



## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury. Merci à **Fatiha Nothias** et **Hilde Van Esch** d'avoir bien voulu endosser le rôle de rapportrice de mon manuscrit de thèse. Je souhaite remercier également les deux examinateurs de ma thèse : **Irina Giurgea** et **Alfonso Represa** qui ont accepté d'examiner et juger ce travail. Merci à **Marc Delpech** d'avoir accepté de présider ce jury.

Je voudrai exprimer ma plus profonde gratitude et mon amitié indéfectible à **Jamel Chelly** pour m'avoir toujours fait confiance et poussé vers le haut. Merci d'avoir su tirer de moi le meilleur, de m'avoir guidé, fait évoluer et fait repousser mes limites pendant ces onze dernières années! Merci de m'avoir fait vivre des expériences professionnelles que je n'aurai pas osé imaginer (notamment nos voyages à Chicago et Barcelone resteront des grands moments de ces dernières années). Sans vous cette thèse (et ce thésard !) n'aurai(en)t jamais vu le jour.

Je tiens à remercier très sincèrement **Fiona Francis**. Cela fait également onze ans que nos chemins se croisent et c'est un bonheur pour moi que tu m'ais ouvert les portes de ton laboratoire à l'Institut du Fer à Moulin pour apprendre les secrets de l'électroporation *in utero* après m'avoir appris la PCR, le western et bien d'autre chose à mes début à Cochin. Merci d'avoir toujours pris du temps pour me voire, nos discussions ont toujours été des moments enrichissants, merci pour tous tes conseils et ta bienveillance à mon égard en toute circonstance. Malgré tous mes efforts je n'ai jamais réussi à faire craquer ton flegme britannique (« Everything is under control ! »).

C'est dans cette partie que les choses se gâtent pour moi car en plus d'être des collègues, la plupart des personnes que j'ai à remercier ici sont aussi des amis.

Un grand merci à ma jumelle **Karine**, nous travaillons ensemble depuis la nuit des temps, une époque où la méthode de pointe pour la recherche de mutation était la DHPLC !! Pour dire que ça date !!! Comme des frères, on joue collectif, on se chamaille, on peut compter l'un sur l'autre et on ne peut (presque) pas publier l'un sans l'autre!

Une pensée affectueuse pour mon petit frère **Xavier** qui m'a tellement appris et tellement fait rire! Ton esprit plane encore en 5009, ta thèse est toujours un ouvrage de référence, nous apprenons au nouveau jeune courageux à respecter ton travail et ta mémoire !!

Merci à **Juliette** pour tout ce temps passé ensemble au labo et en dehors. Avec toi j'ai arrêté les clopes, repris les clopes, arrêté le chocolat chaud, repris le chocolat chaud, arrêté la science et repris la science en 5 minutes chrono et jamais essayé d'arrêter le café. Ces 5 minutes partagées ensemble quotidiennement ont souvent changé la physionomie de ma journée, merci de m'avoir souvent remis sur les rails grâce à ton énergie et ta foi inébranlable dans notre métier.

Un grand merci à **Elodie** qui m'a permis de me sentir comme chez moi à l'IFM. Ton tempérament, ta bonne humeur, ta connaissance du développement corticale et ton amitié ont été inestimable lors de mes longs passages à l'IFM.

Merci à **Julie**, ton arrivée a donné une bouffée d'oxygène au labo. Comment peut-on être une femme aussi complète ?? ;-). J'aime ton expertise, ton esprit brillant et ton goût vestimentaire ! Tu es au TOP !

Merci au duo de choc qui a fait avancer ce projet à la vitesse de la lumière lors du sprint final : **Loic** (Piccolo) et **Giuseppe** (Piccolo Grande). C'est une belle équipe qui s'est créée et à qui rien ne va résister (Forza Italia !).

Evidemment, à eux s'ajoute l'incomparable **Nico** ! Que dire de ce demi-dieu de la biologie moléculaire, du Michel-Ange du clonage, du Stradivarius de la PCR quantitative et du Camille Lacourt de la piscine de Montparnasse?? A part peut être d'exprimer toute ma gratitude et mon attachement! Tu es indispensable mon petit chat !!! Heureusement que tu ne prends pas l'avion, sinon les américains t'auraient déjà arraché à nous!

Merci à **Nadia** pour sa fougue légendaire ! Tu as toujours trouvé un moment dans ton emploi du temps de ministre pour répondre à mes questions de novice sur la clinique et pour me faire part de tes éclairages. Merci beaucoup.

Merci à **Pierre**, toujours là quand on en a besoin, à la fois Einstein et Inspecteur Gadget.

Un gros merci à **Laetitia**, notre tata préférée, tu as toujours été la présence rassurante dont tout le monde a besoin. Ton absence a créé un grand vide dans nos cœurs.

Une pensée pour celles avec qui j'ai travaillé ces dernières années et qui m'ont laissé de très bons souvenirs: **Chloé, Sandra, Madison** et **Hélène**.

Je remercie également tous les membres de mon équipe pour leur soutien et leur amitiés au quotidien : **Thierry, Olivier, Chloé, Mariana, Rodrick, Adrienne** et **France**.

Bien sûr je n'oublie pas les « anciens » du labo avec qui j'ai partagé tant de choses : **Caroline, Fatma, Alice, Haydeé, Yann, Gaëlle, Fabien, Cédric J, Cédric T, Julie LM, Julie S** et ma princesse **Magda**.

Mes pensées amicales vont aussi à celles qui nous facilitent la vie et pour qui j'ai une grande affection : **Maryse** et **Emilie, Nathalie, Mimie, Josiane, Annick** et **Raymonde**. Merci les filles !!

J'exprime également toute ma reconnaissance aux membres de ma deuxième équipe, celle de l'IFM. Merci **Françoise** pour ton sourire, et ta douceur, merci à **Katia, Audrey** et **Réham** d'avoir toujours pris sur leur temps précieux pour m'aider. Merci également à **Richard** pour ses conseils et son expertise qu'il essaye de nous transmettre à nous les bidouilleurs du développement cortical.

J'ajoute à cette liste de remerciements à mes collaborateurs le Dr **Catherine Fallet** qui pendant des années a essayé de m'ouvrir les yeux sur le monde fascinant de la neuro-foetopathologie.

Evidemment je n'aurai pas passé à travers ces quatre longues années sans le soutien de mes proches. Merci à mes **grands parents** et mes **parents** qui m'ont toujours soutenu dans cette idée folle d'être « Docteur ». Merci particulièrement à ma **mère** et **Joël** d'avoir avalé ce manuscrit en un temps record pour y chasser le maximum de fautes. Merci à mes amis qui me demande encore « tu bosses sur quoi exactement ? » et à ceux qui ont laissé tombé notamment à ma **Sard** qui se passionne parfois presque plus que moi pour ma vie professionnelle.

# TABLE DES MATIERES

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| REMERCIEMENTS .....                                                    | 3  |
| TABLE DES MATIERES .....                                               | 6  |
| LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....                                     | 11 |
| LISTE DES ABREVIATIONS .....                                           | 13 |
| INTRODUCTION .....                                                     | 16 |
| 1. Le développement cortical.....                                      | 17 |
| 1.1 La neurogenèse .....                                               | 18 |
| 1.1.1 Les cellules de Cajal-Retzius .....                              | 19 |
| a- Caractéristiques.....                                               | 19 |
| b- Origines.....                                                       | 19 |
| c- Rôles .....                                                         | 19 |
| 1.1.2 Les éminences ganglionnaires et diversité des interneurones..... | 20 |
| a- L'éminence ganglionnaire médiane .....                              | 20 |
| b- L'éminence ganglionnaire caudale .....                              | 21 |
| c- L'éminence ganglionnaire latérale .....                             | 21 |
| d- L'aire antérieure préoptique .....                                  | 22 |
| 1.1.3 Les Zones ventriculaire et sub-ventriculaire .....               | 22 |
| a- Les cellules souches neuroépithéliales.....                         | 22 |
| b- La glie radiaire.....                                               | 23 |
| (i) Division symétrique .....                                          | 24 |
| (ii) Division asymétrique.....                                         | 24 |
| c- Les progéniteurs intermédiaires.....                                | 25 |
| d- Les GR basales .....                                                | 25 |
| e- Détermination du mode de division.....                              | 26 |
| (i) Plan du clivage mitotique .....                                    | 26 |
| (ii) Contrôle du cycle cellulaire.....                                 | 28 |
| f- Progéniteurs et expansion corticale .....                           | 28 |
| (i) Participation des progéniteurs intermédiaires.....                 | 29 |
| (ii) Participation des GRb.....                                        | 30 |
| 1.2 La migration neuronale .....                                       | 31 |

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.2.1 La migration tangentielle .....                                       | 31 |
| a- Patron de migration.....                                                 | 31 |
| b- Morphologie et mouvement de l'interneurone en migration .....            | 32 |
| c- Régulation moléculaire de la nucléokinèse.....                           | 33 |
| 1.2.2 Migration radiaire .....                                              | 34 |
| a- La translocation nucléaire. ....                                         | 35 |
| b- La migration en quatre étapes .....                                      | 35 |
| (i) Initiation de la migration .....                                        | 35 |
| (ii) Phase multipolaire .....                                               | 36 |
| (iii) Phase rétrograde.....                                                 | 37 |
| (iv) Migration radiaire par locomotion .....                                | 38 |
| c- Migration inside-out et mise en place de la lamination corticale.....    | 38 |
| 1.3 La différenciation neuronale .....                                      | 40 |
| 1.3.1 Organisation corticale .....                                          | 40 |
| 1.3.2 Les interneurones.....                                                | 41 |
| 1.3.3 Les neurones pyramidaux .....                                         | 42 |
| 2. Le réseau de microtubules .....                                          | 44 |
| 2.1 Les sous unités $\alpha$ - et $\beta$ -tubulines .....                  | 44 |
| 2.1.1 Gènes des tubulines .....                                             | 44 |
| 2.1.2 Structures .....                                                      | 46 |
| 2.1.3 Profil d'expression.....                                              | 47 |
| 2.1.4 La voie d'hétérodimérisation .....                                    | 48 |
| 2.2 Les modifications post-traductionnelles .....                           | 49 |
| 2.2.1 Les cycles de détyrosination-tyrosination.....                        | 50 |
| 2.2.2 L'acétylation .....                                                   | 50 |
| 2.2.3 Polyglutamylation et polyglycylation .....                            | 51 |
| 2.3 L'hypothèse multi-tubuline .....                                        | 51 |
| 2.4 Microtubules et morphogenèse neuronale <i>in vitro</i> .....            | 52 |
| 2.4.1 Etape de l'acquisition de la polarité neuronale <i>in vitro</i> ..... | 53 |
| a- La neuritogenèse .....                                                   | 53 |
| b- L'axonogenèse .....                                                      | 54 |
| c- La dendritogenèse .....                                                  | 54 |



|                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------|----|
| 2.4.2 Dynamique des microtubules et morphogenèse neuronale ..... | 55 |
| a- Contrôle de la balance polymérisation-dépolymérisation .....  | 55 |
| (i) La polymérisation.....                                       | 55 |
| (ii) La dépolymérisation.....                                    | 57 |
| b- Contrôle de la stabilité des MT.....                          | 57 |
| (i) Les MAPs classiques .....                                    | 57 |
| (ii) Les protéines STOP.....                                     | 59 |
| (iii) Doublecortine .....                                        | 59 |
| (iv) Les protéines des extrémités (+).....                       | 60 |
| c- Modulation de l'activité des MAP par phosphorylation .....    | 61 |
| 3. Les malformations du développement cortical .....             | 62 |
| 3.1 Introduction.....                                            | 62 |
| 3.2 Les lissencéphalies classique ou de type I.....              | 64 |
| 3.2.1 Caractéristiques.....                                      | 64 |
| 3.2.2 Bases Génétiques .....                                     | 65 |
| a- <i>DCX</i> et <i>LIS1</i> .....                               | 65 |
| (i) <i>LIS1</i> .....                                            | 65 |
| (ii) <i>DCX</i> .....                                            | 67 |
| b- <i>ARX</i> et <i>RELN</i> .....                               | 69 |
| 3.3 Les Hétérotopies .....                                       | 69 |
| 3.3.1 Les hétérotopies laminaires sous corticales .....          | 70 |
| a- Caractéristiques.....                                         | 70 |
| b- Bases Génétiques .....                                        | 70 |
| 3.3.2 Les hétérotopies nodulaires péri-ventriculaires .....      | 71 |
| a- Caractéristiques.....                                         | 71 |
| c- Bases Génétiques .....                                        | 71 |
| 3.3 Les polymicrogyries .....                                    | 73 |
| 3.3.1 Caractéristiques.....                                      | 74 |
| 3.3.2 Bases Génétiques .....                                     | 75 |
| a- Les PMG bilatérales péri-sylviennes.....                      | 75 |
| b- Les PMG bilatérales fronto-pariétales.....                    | 76 |
| c- Autres formes de PMG .....                                    | 77 |

|                                                                                                                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.3 Les Tubulinopathies.....                                                                                                                                                                               | 77  |
| 3.3.1 TUBA1A.....                                                                                                                                                                                          | 78  |
| 3.3.2 TUBB2B.....                                                                                                                                                                                          | 79  |
| 3.3.3 TUBB5 .....                                                                                                                                                                                          | 81  |
| 3.3.4 TUBB3 .....                                                                                                                                                                                          | 81  |
| 3.3.5 TUBB4A.....                                                                                                                                                                                          | 84  |
| 3.3.6 TUBG1.....                                                                                                                                                                                           | 84  |
| RESULTATS.....                                                                                                                                                                                             | 91  |
| Article 1 : Des mutations dans la sous-unité tubuline $\beta$ neuronale TUBB3 résultent en une malformation du développement cortical et des défauts de la migration neuronale.....                        | 92  |
| Article 2 : Les isoformes de tubulines $\beta$ ne sont pas interchangeables pour restaurer l'altération de la migration radiaire due à l'inactivation de <i>Tubb3</i> (sous presse).....                   | 108 |
| Données complémentaires de l'article 2 .....                                                                                                                                                               | 121 |
| Résultats non publiés:.....                                                                                                                                                                                | 123 |
| Etude de la croissance des MT dans les fibroblastes de patients porteurs de mutations <i>TUBB3</i> .....                                                                                                   | 123 |
| Etude de la dépolymérisation des MT au froid dans les fibroblastes de patients mutés dans <i>TUBB3</i> .....                                                                                               | 124 |
| Article annexe 1 : Elargissement du spectre des dysgénésies corticales liées à <i>TUBA1A</i> aux polymicrogyries.....                                                                                      | 125 |
| Article annexe 2 : Les mutations dans les gènes <i>TUBG1</i> <i>DYNC1H1</i> , <i>KIF5C</i> et <i>KIF2A</i> sont responsables de malformations du développement cortical associées à une microcéphalie..... | 131 |
| DISCUSSION .....                                                                                                                                                                                           | 146 |
| 1. Implication de <i>TUBB3</i> dans des formes de MDC. ....                                                                                                                                                | 147 |
| 1.1 Un gène, deux pathologies.....                                                                                                                                                                         | 147 |
| 1.2 Actualisation du concept de tubulinopathie.....                                                                                                                                                        | 149 |
| 2. Mécanisme d'action des mutations <i>TUBB3</i> .....                                                                                                                                                     | 150 |
| 3. Rôle de TUBB3 dans la migration radiaire : .....                                                                                                                                                        | 151 |
| 3.1 Défauts des neurones pyramidaux en migration.....                                                                                                                                                      | 151 |
| 3.1.1 Retard de la migration radiaire .....                                                                                                                                                                | 151 |
| 3.1.2 Anomalies morphologiques des cellules neuronales multipolaires .....                                                                                                                                 | 152 |
| 3.2 Défauts des progéniteurs intermédiaires .....                                                                                                                                                          | 154 |

|                                                                                           |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4. Apport des approches génétiques à l'hypothèse « multi-tubuline » .....                 | 157 |
| 5. Extension des MDC relatives aux MT : vers un mécanisme physiopathologique unique ..... | 158 |
| 6. Perspectives de l'exploration du rôle de TUBB3 dans le développement cortical .....    | 159 |
| BIBLIOGRAPHIE.....                                                                        | 162 |

## **LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX**

|                                                                                                                                                                                                              |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Figure 1 : Modèle schématique revisité du développement cortical du comité Boulder.</b> .....                                                                                                             | <b>17</b>  |
| <b>Figure 2 : Illustration schématique d'une coupe coronale d'un hémisphère cérébral embryonnaire de rongeur (A) et d'humain (B).</b> .....                                                                  | <b>18</b>  |
| <b>Figure 3 : Routes migratoires des interneurones (A) et contribution relative des éminences ganglionnaires aux sous populations d'interneurones exprimant des neurotransmetteurs différents (B).</b> ..... | <b>21</b>  |
| <b>Figure 4 : Caractéristiques de polarisation et mouvement nucléaire intercinétique des cellules neuroépithéliales et des glies radiaires et arbre de lignage de la neurogenèse.</b> .....                  | <b>23</b>  |
| <b>Figure 5 : Schéma d'une glie radiaire et d'un neurone en migration. (D'après Rakic, 2007).</b> .....                                                                                                      | <b>23</b>  |
| <b>Figure 6 : Glies radiaires et glies radiaires basales du cortex humain en développement.</b> .....                                                                                                        | <b>26</b>  |
| <b>Figure 7 : Plan de clivage des divisions des cellules neuroépithéliales et des cellules de la glie radiaire.</b> .....                                                                                    | <b>27</b>  |
| <b>Figure 8 : Représentation de l'hypothèse de l'unité radiaire.</b> .....                                                                                                                                   | <b>29</b>  |
| <b>Figure 9 : Participation des progéniteurs intermédiaires et des glies radiaires basales à l'apparition de la gyration corticale.</b> .....                                                                | <b>30</b>  |
| <b>Figure 10 : Trajets migratoires des interneurones.</b> .....                                                                                                                                              | <b>32</b>  |
| <b>Figure 11 : Morphologie de l'interneurone en migration et nucléokinèse.</b> .....                                                                                                                         | <b>33</b>  |
| <b>Figure 12 : Modes de migration des neurones pyramidaux.</b> .....                                                                                                                                         | <b>35</b>  |
| <b>Figure 13 : Migration radiaire en quatre étapes.</b> .....                                                                                                                                                | <b>37</b>  |
| <b>Figure 14 : Formation des couches corticales.</b> .....                                                                                                                                                   | <b>39</b>  |
| <b>Figure 15 : Les couches du cortex cérébral humain.</b> .....                                                                                                                                              | <b>40</b>  |
| <b>Figure 16 : Diversité des interneurones</b> .....                                                                                                                                                         | <b>41</b>  |
| <b>Figure 17 : Morphologie et diversité des projections des neurones pyramidaux.</b> .....                                                                                                                   | <b>42</b>  |
| <b>Figure 18 : Les microtubules, une structure dynamique.</b> .....                                                                                                                                          | <b>44</b>  |
| <b>Figure 19 : Structure protéique des tubulines.</b> .....                                                                                                                                                  | <b>46</b>  |
| <b>Figure 20 : Voie d'hétérodimérisation des tubulines.</b> .....                                                                                                                                            | <b>48</b>  |
| <b>Figure 21 : Modifications post-traductionnelles des tubulines</b> .....                                                                                                                                   | <b>49</b>  |
| <b>Figure 22 : Réorganisation des microtubules lors de la morphogenèse in vitro.</b> .....                                                                                                                   | <b>53</b>  |
| <b>Figure 23 : Organisation et régulation des microtubules dans l'axone en développement.</b> .....                                                                                                          | <b>56</b>  |
| <b>Figure 24 : Protocole d'électroporation in utéro chez la souris.</b> .....                                                                                                                                | <b>63</b>  |
| <b>Figure 25 : Pachyrie et agyrie</b> .....                                                                                                                                                                  | <b>64</b>  |
| <b>Figure 26 : Formation de la lamination corticale dans le modèle murin hétérozygote composite KO/sLis1. ...</b>                                                                                            | <b>66</b>  |
| <b>Figure 27 : Résumé des phénotypes créés par la surexpression ou l'inhibition de Flna, Lis1 et Dcx sur la morphologie des neurones pyramidaux en migration.</b> .....                                      | <b>67</b>  |
| <b>Figure 28 : Sauvetage de l'hétérotopie neuronale due à l'inactivation de Dcx par son réexpression.</b> .....                                                                                              | <b>68</b>  |
| <b>Figure 29 : Représentation schématique des hétérotopies.</b> .....                                                                                                                                        | <b>70</b>  |
| <b>Figure 30 : Effet de l'électroporation in utero de l'ARNsh anti-Flna sur la migration radiaire.</b> .....                                                                                                 | <b>73</b>  |
| <b>Figure 31 : Différents types de polymicrogyries</b> .....                                                                                                                                                 | <b>75</b>  |
| <b>Figure 32 : Sauvetage du phénotype de migration radiaire due à l'ARNsh anti-Srpx2 par la Tubacine.</b> .....                                                                                              | <b>76</b>  |
| <b>Figure 33 : Anomalies morphologique de l'hippocampe des modèles murins Dcx et Tuba1a.</b> .....                                                                                                           | <b>79</b>  |
| <b>Figure 34 : Spectre des MDC observées dans les patients présentant des mutations dans les sous-unités tubulines.</b> .....                                                                                | <b>80</b>  |
| <b>Figure 35 : Défauts d'axonogenèse dues à la sur-expression de mutants de TUBB3 par un mécanisme de dominant négatif.</b> .....                                                                            | <b>83</b>  |
| <b>Figure 36 : Profil d'expression de Tubb3 et Tbr2</b> .....                                                                                                                                                | <b>122</b> |
| <b>Figure 370 : Schéma de l'hypothèse de participation du positionnement neuronal à la prolifération des progéniteurs neuronaux.</b> .....                                                                   | <b>156</b> |

|                                                                                                                                 |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tableau 1 : Tableau récapitulatif des gènes codant les sous-unités tubulines chez l'homme et la souris. ....</b>             | <b>45</b> |
| <b>Tableau 2 : Profiles d'expression des sous-unités tubulines <math>\alpha</math> et <math>\beta</math> chez l'homme. ....</b> | <b>47</b> |
| <b>Tableau 3 : Récapitulatif des gènes responsables de MDC et phénotypes murins associés .....</b>                              | <b>85</b> |

## LISTE DES ABREVIATIONS

**ARFGEF2** Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2

**ARNi** ARN interference

**ARNsh** ARN small hairpine

**ARX** Aristaless related homeobox

**ASPM** Abnormal Spindle-like Microcephaly-associated

**ATP** Adénosine TriPhosphate

**ATR** Ataxia Telangiectasia and Rad3 related

**B3GALNT2** beta-1,3-N-acetyl-galactosaminyl-transferase 2

**B3GNT1** N-acetyllactosaminide beta-1,3-N-acetyl-glucosaminyl-transferase

**CASC5** Cancer Susceptibility Candidate 5

**CB** Calbindine

**CEP152** Centrosomal Protein of 152 kDa

**CFEOM** Congenital fibrosis of the extraocular muscles

**CDK5RAP2** Cyclin-dependent Kinase 5 Regulatory-Associated Protein 2

**CENPJ** Centromere-associated Protein J

**CR** Calretinine

**CRMP** collapsin response Mediator Protein

**DCC** Deleted in Colorectal Cancer

**DCLK** Doublecortin Like Kinase

**DCX** Doublecortine

**DYNC1H1** Cytoplasmic Dynein 1 Heavy chain 1

**EB1/2/3** End-Binding protein 1/2/3

**ENU** N-ethyl-N-nitrosourea

**FKRP** Fukutin-Related Protein

**FKTN** Fukutin

**FLNA** Filamine A

**GABA** Gamma-Aminobutyric Acid

**GDP** Guanosine DiPhosphate

**GFAP** Glial Fibrillary Acidic Protein

**GFP** Green fluorescent Protein

**GPR56** G Protein-coupledreceptor 56

**GR** Glie radiaire

**GRb** Glie radiaire basale

**GTDC2** Glycosyltransferase-like domain containing 2

**GTP** Guanosine TriPhosphate

**HLSC** Hétérotopie laminaire Sous-corticale

**HNPV** Hétérotopie nodulaire péri-ventriculaire

**IRM** Imagerie par Résonance Magnétique

**ISPD** Isoprenoid Synthase Domain containing.

**KO/I** Knock Out/In

**LAMB1** Laminin, Beta 1

**LIS1/2** Lissencéphalie de type 1/2

**MAP** Microtubule Associated protéine

**MCPH1** Microcéphaline

**MDC** Malformation du Développement Cortical

**MT** Microtubules

**MTOC** Microtubule Organizing Center

**NDE1** NudE neurodevelopment protein 1

**NPY** Neuropeptide Y

**PAFAH1B1** Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase, non catalytic isoforme1b

**PAX6** Paired box gene 6

|                                                                            |                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| <b>PC</b> Plaque Corticale                                                 | <b>SST</b> Somatostatine                           |
| <b>PI</b> Progéniteur Intermédiaire                                        | <b>STIL</b> SCL-Interrupting Locus                 |
| <b>PMG</b> Polymicrogyries                                                 | <b>STOP</b> Stable Tubule-Only Peptide             |
| <b>PBP</b> Polymicrogyrie Bilatérale Péri-sylvienne                        | <b>TBCA/B/C/D/E</b> Tubulin folding Cofactor       |
| <b>POMGnT1</b> O-linked-mannose beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1 | <b>TBR2</b> T-Box brain 2                          |
| <b>POMT1/2</b> O-mannosyl-transferase 1                                    | <b>TMEM5</b> Transmembrane protein 5               |
| <b>PP</b> Pré-Plaque                                                       | <b>VLDLR</b> Very-Low-Density-Lipoprotein Receptor |
| <b>PV</b> Parvalbumine                                                     | <b>ZAM</b> Zone d'Accumulation Multipolaire        |
| <b>RELN</b> Reelin                                                         | <b>ZI</b> Zone Intermédiaire                       |
| <b>SAD-A/B</b> Synapses of Amphids defective A/B                           | <b>ZSV</b> Zone Sous Ventriculaire                 |
| <b>SHH</b> Sonic Hedgehog                                                  | <b>ZSVE</b> Zone Sous Ventriculaire Externe        |
| <b>SNC</b> Système nerveux central                                         | <b>ZSVI</b> Zone Sous Ventriculaire Interne        |
| <b>SRPX2</b> Sushi Repeat-containing Protein 2                             | <b>ZV</b> Zone Ventriculaire                       |
|                                                                            | <b>WDR62</b> WD Repeat-containing protein 62       |

# INTRODUCTION



## INTRODUCTION

Le cortex cérébral est la couche externe supérieure de l'encéphale contenant les corps cellulaires des neurones. D'origine prosencéphalique, c'est la région du cerveau la plus récemment acquise au cours de l'évolution et le siège principal des fonctions cognitives. D'une organisation très complexe, il résulte de différents processus coordonnés qui comprennent la neurogenèse, la migration et la différenciation neuronales. L'altération d'un ou plusieurs de ces processus peut entraîner chez l'homme l'apparition de malformations cérébrales congénitales parmi lesquelles on distingue notamment les malformations du développement corticale ou MDC.

Ces pathologies ont pour principale caractéristique un trouble de la gyration du cortex pouvant être associé à des anomalies dans d'autres régions cérébrales (cervelet, tronc cérébral, corps calleux, ganglions de la base..). Les patients atteints de MDC présentent une déficience intellectuelle modérée à sévère souvent associée à une épilepsie sévère pharmaco-résistante.

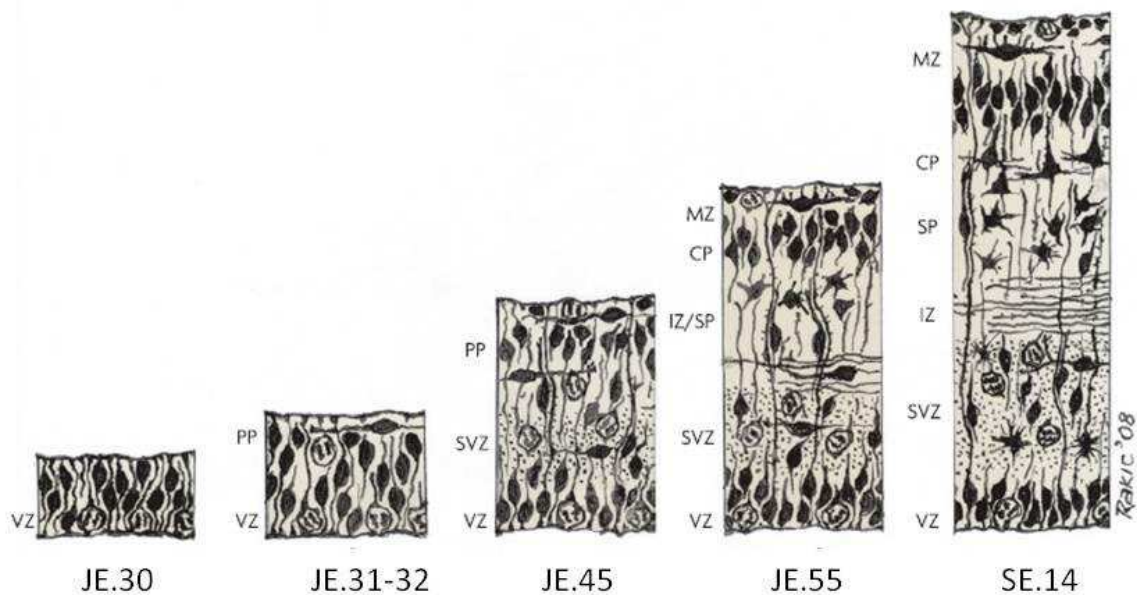
Depuis une quinzaine d'années, les approches neurobiologiques en combinaison avec les avancées prodigieuses de la génétique humaine ont permis d'identifier l'origine moléculaire et les mécanismes physiopathologiques de nombreux cas de ces pathologies. L'un des aspects les plus intéressants de ces découvertes est l'émergence d'un lien fonctionnel entre de nombreux gènes responsables de ces malformations. En effet, l'identification de mutations chez des patients présentant des MDC dans les gènes *DCX* et *LIS1* codant des protéines s'associant directement ou indirectement aux microtubules a montré le rôle primordial du cytosquelette dans le développement cortical. Ce constat fut renforcé par la découverte de mutations dans des gènes codant des tubulines (*TUBA1A*, *TUBB2B* et *TUBB5*), unités structurales et fonctionnelles des microtubules. Ces dernières découvertes ont notamment relancé les débats concernant l'existence d'une redondance ou d'une spécificité fonctionnelle des membres de cette famille de protéines.

Les explorations des conséquences de ces mutations qui s'en suivirent, aux niveaux biochimique, cellulaire ou *in vivo* dans des modèles de rongeurs ont permis des avancées significatives dans la compréhension des fonctions protéiques des gènes étudiés, dans l'exploration des mécanismes physiopathologiques de ces maladies mais aussi de mieux disséquer les processus soutenant le développement cortical normal.

Dans cette introduction, nous présenterons (i) les principales étapes du développement cortical, (ii) les caractéristiques de la famille des tubulines et de leur protéines associées, ainsi que leurs rôles dans le développement du système nerveux central et (iii) la génétique et la physiopathologie des principaux groupes de MDC étudiés au sein du laboratoire où a eu lieu ce travail.

# 1. Le développement cortical

La mise en place de l'isocortex cérébral nécessite la génération d'un grand nombre de neurones, leur migration jusqu'à la plaque corticale (PC) et enfin la mise en place de la connectivité neuronale. Ces étapes, mènent à partir d'un neuroépithélium très fin et lisse, à la formation d'un cortex gyré, organisé en six couches, constitué de différents types neuronaux et gliaux (Figure 1).



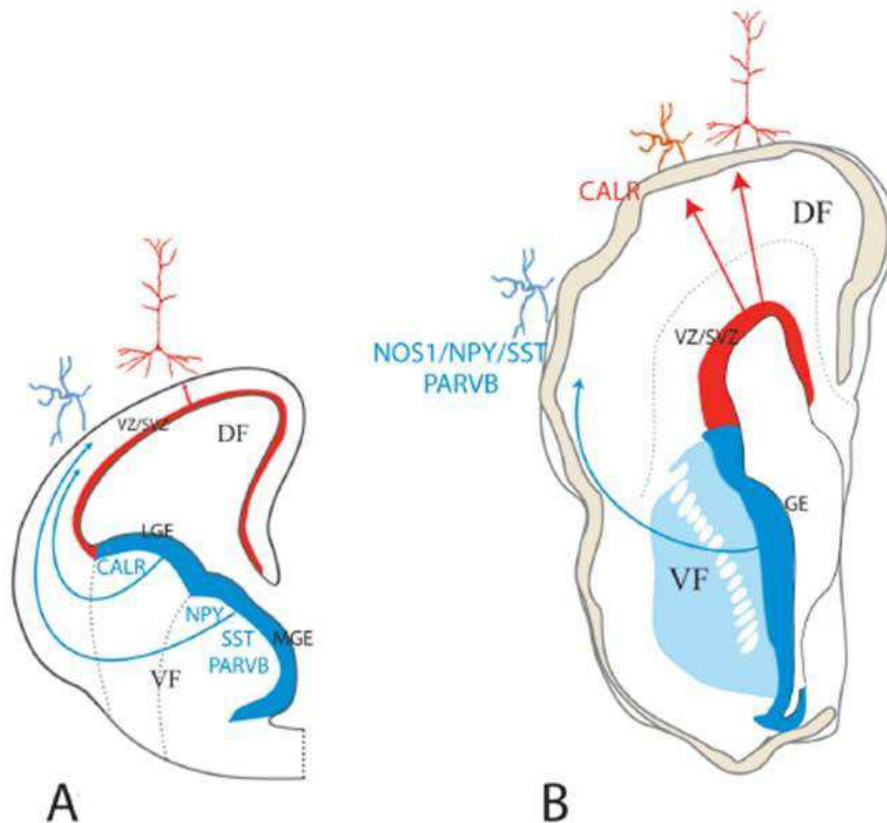
**Figure 1 : Modèle schématique revisité du développement cortical du comté Boulder.**

Sont représentés les stades développementaux des jours embryonnaires (JE) 30, 31-32, 45, 55 et à la semaine embryonnaire (SE) 14. VZ : Zone Ventriculaire, PP : Préplaque, SVZ : Zone sub-ventriculaire, IZ : Zone intermédiaire, SP : Sous-plaque, CP : Plaque corticale, MZ : Zone marginale

La population gliale est constituée (i) d'astrocytes, acteurs importants de l'homéostasie des synapses neuronales, (ii) d'oligodendrocytes permettant la myélinisation axonale et (iii) de cellules de la microglie, principale système de défense immunitaire du SNC.

Les neurones corticaux sont divisés en deux principaux groupes : les interneurones et les neurones pyramidaux qui vont former un réseau complexe de connections. Les interneurones, représentant  $\approx 20\%$  des neurones présents dans le cortex, sont pour l'essentiel inhibiteurs et sécrètent le neurotransmetteur GABA. Ils sont divisés en sous-groupes très hétérogènes morphologiquement et fonctionnellement exprimant ou co-exprimant différents marqueurs tels que la parvalbumine, la somatostatine, la calrétinine ou le neuropeptide Y. Les cellules pyramidales représentent  $\approx 80\%$  des neurones du cortex et utilisent le glutamate comme neurotransmetteur excitateur. Ce sont des neurones de projections qui étendent des axones vers d'autres régions du cortex ou vers des cibles extra-corticales parfois physiquement très éloignées. La génération de ces deux types neuronaux a lieu dans deux régions distinctes : les éminences ganglionnaires qui génèrent les interneurones inhibiteurs et la zone ventriculaire (ZV) corticale d'où proviennent les

neurones pyramidaux. De part leurs origines différentes, ces deux types de neurones entreprennent des types de migration différents pour rejoindre le cortex : la migration tangentielle pour les interneurones et la migration radiale pour les neurones pyramidaux (Figure 2).



**Figure 2 : Illustration schématique d'une coupe coronale d'un hémisphère cérébral embryonnaire de rongeur (A) et d'humain (B).**

Les interneurones (en bleu) sont générés dans les éminences ganglionnaires (EG) et migrent tangemment pour atteindre le cortex alors que les neurones pyramidaux (en rouge), provenant des zones ventriculaire (VZ) et sub-ventriculaire (SVZ), migrent radialement vers le cortex. Les interneurones exprimant des neurotransmetteurs différents proviennent de régions différentes des éminences. (d'après Rakic *et al.*, 2009)

## 1.1 La neurogenèse

Après la fermeture du tube neural, sa polarisation puis sa régionalisation sous l'effet de facteurs morphogéniques, la neurogenèse débute chez la souris vers le jour E10 et chez l'Homme au jour embryonnaire 33. Elle a lieu dans deux régions différentes du télencéphale suivant la nature des neurones générés. Nous commencerons par présenter le cas particulier des cellules de Cajal-Retzius avant de présenter la neurogenèse présente dans les éminences ganglionnaires du subpallium et dans la zone ventriculaire de l'isocortex.

### 1.1.1 Les cellules de Cajal-Retzius

Décrites par Cajal en 1890 chez les rongeurs, puis en 1893 dans le cerveau humain, puis confirmées par Retzius en 1899, les cellules de Cajal-Retzius (CR), sont réparties sur toute la partie superficielle du cortex cérébral. Ce sont les premiers neurones différenciés du télencéphale.

#### a- Caractéristiques

Les cellules de CR ont une morphologie stéréotypée, un arbre dendritique radial accroché à la surface piaie et des projections axonales tangentielles dans la même couche marginale (couche la plus externe du cortex) que le corps cellulaire. Ce sont essentiellement des neurones excitateurs glutamatergiques. Bien qu'ils expriment tous Reelin et la Calrétinine, le terme « cellules de Cajal-Retzius » désigne en réalité une population neuronale anatomiquement hétérogène et qui peut se différencier par l'expression des gènes *Lhx 6* (Lavdas *et al.*, 1999), *Tbr1* (Hevner *et al.*, 2001), *Emx2* (Mallamaci *et al.*, 2000) ou *p73* (Meyer *et al.*, 2002).

#### b- Origines

L'origine de ces cellules est variée. Elles sont générées entre E10 et E12 chez la souris et font donc partie des premiers neurones corticaux produits. Leurs lieux d'origine est encore une question étudiée, mais on admet quatre zones progénitrices :

- La région du septum (Bielle *et al.*, 2005)
- Le pallium ventro-latéral (Bielle *et al.*, 2005)
- Le plexus choroïde (Garcia-Moreno *et al.*, 2007)
- L'hème cortical (Garcia-Moreno *et al.*, 2007)

Les cellules de CR migrent de façon tangentielle pour atteindre leur destination dans la zone marginale.

#### c- Rôles

Les cellules de CR ont un rôle primordial dans la régulation de la lamination du cortex. On leur reconnaît entre autre la sécrétion axonale de Reelin (Derer *et al.*, 2001; Marin-Padilla, 1998). Reelin est une grande glycoprotéine extracellulaire qui agit comme un signal dans la zone marginale pour réguler la migration dans la plaque corticale des neurones qui expriment les

récepteurs moléculaires VLDLR et ApoER2. De nombreuses études suggèrent que Reelin régule la migration et le positionnement des neurones dans la plaque corticale et qu'elle aurait la capacité de promouvoir le détachement des neurones de la glie radiaire à l'étape finale de la migration (Dulabon *et al.*, 2000; Hack *et al.*, 2002). Toutefois le rôle de Reelin n'est pas encore complètement tranché notamment au sujet de son possible rôle de promoteur de la migration neuronale.

Les cellules de CR sont également impliquées dans la maintenance de la glie radiaire (Soriano *et al.*, 1997), elles peuvent aussi réguler la formation de la circuiterie neuronale en partie grâce à la signalisation de Reelin et la sécrétion de neurotransmetteur (Marin-Padilla, 1998).

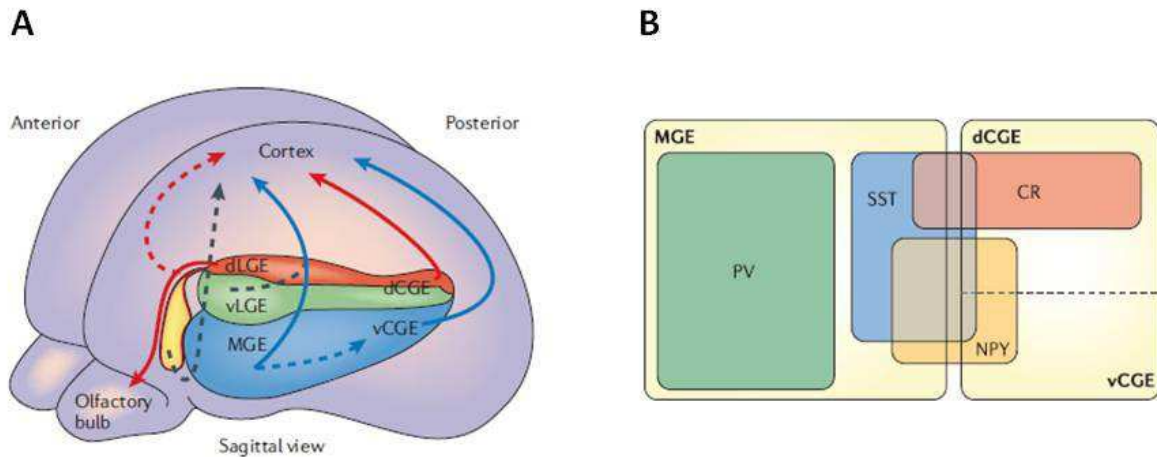
Il a été montré que la plupart des cellules de CR (95%) disparaissent au cours du développement chez la souris et chez l'Homme pour ne laisser qu'une petite population résiduelle à l'âge adulte confirmant bien le rôle essentiellement développemental de ces cellules (del Rio *et al.*, 1995; Soda *et al.*, 2003).

### *1.1.2 Les éminences ganglionnaires et diversité des interneurones*

Chez les rongeurs et chez l'homme, les interneurones corticaux sont générés durant l'embryogénèse dans deux structures subpalliales transitoires, les éminences ganglionnaires médianes (EGM) et caudales (EGC), puis atteignent le cortex par migration tangentielle (Figure 3-A). Les caractéristiques et les modes de divisions des progéniteurs des interneurones dans les éminences ganglionnaires sont peu documentés. Néanmoins les caractéristiques fonctionnelles de ce type neuronal sont intimement liées à leurs lieux de provenance.

#### **a- L'éminence ganglionnaire médiane**

Les progéniteurs neuronaux présents dans l'EGM sont la première source d'interneurones corticaux chez les rongeurs. L'EGM exprime les facteurs de transcriptions Nkx2.1 et Lhx6 de façon prédominante. Le modèle murin d'inactivation de Nkx2.1 a montré l'importance de la participation de l'EGM dans la génération des interneurones corticaux puisqu'il présente une diminution de 50% du nombre de neurones GABAergiques dans le néocortex (Sussel *et al.*, 1999). La plupart des interneurones provenant de l'EGM expriment la parvalbumine ou la somatostatine. Cette expression définit deux sous groupes neurochimiques distincts qui tendent à recouvrir deux groupes aux caractéristiques physiologiques et de connectivités différentes. Ces deux populations représentent ~60% des interneurones corticaux chez la souris (Gonchar and Burkhalter, 1997; Kawaguchi and Kubota, 1997). A contrario, les interneurones exprimant la calretinine (CR) sont rarement originaires de l'EGM et seulement une partie des neurones NPY positifs peuvent en provenir (Figure 3-B).



**Figure 3 : Routes migratoires des interneurons (A) et contribution relative des éminences ganglionnaires aux sous populations d'interneurons exprimant des neurotransmetteurs différents (B).**

MGE : éminence ganglionnaire médiane, CGE : éminence ganglionnaire caudale dorsale (dCGE) et ventrale (vCGE), PV : parvalbumine, SST : somatostatine, CR : calrétinine, NPY : neuropeptide Y. ( D'après Wonders et Anderson, 2006)

### **b- L'éminence ganglionnaire caudale**

Décrite plus tardivement que l'EGL, l'EGC est l'autre structure fortement impliquée dans la génération des interneurons corticaux. Cette structure est le résultat de la fusion en rostral de l'EGL et de l'EGL (éminence ganglionnaire latérale). Elle est divisée en deux régions suivant l'expression de facteurs de transcription : la région ventrale (vEGC) exprimant *Nkx2.1* et la région dorsale (dEGC) exprimant *Gsh2* et *ER81*. Alors que les neurones calretinine positifs sont principalement produits dans la dEGC, les interneurons NPY ainsi qu'une petite population des interneurons exprimant la sérotonine peuvent provenir de l'une ou l'autre des deux régions. Une étude chez la souris estime que environ 30 à 40% des interneurons corticaux proviennent de l'EGC (Miyoshi *et al.*, 2010) (Figure3-B).

### **c- L'éminence ganglionnaire latérale**

L'EGL est le foyer de production des neurones du bulbe olfactif. Bien que l'EGL ne semble pas participer de façon majeure à la génération des interneurons corticaux, une étude effectuée chez le rat a montré la présence dans le cortex de cellules provenant de l'EGL et exprimant le GABA (Anderson *et al.*, 2001) (Figure 3-B).

#### **d- L'aire antérieure préoptique**

L'aire antérieure préoptique a été mise en évidence récemment comme étant le lieu de production d'un petit nombre d'interneurones corticaux. On les retrouve à la surface du cortex et environ un tiers d'entre eux expriment le neuropeptide Y mais pas la somatostatine (Gelman *et al.*, 2009).

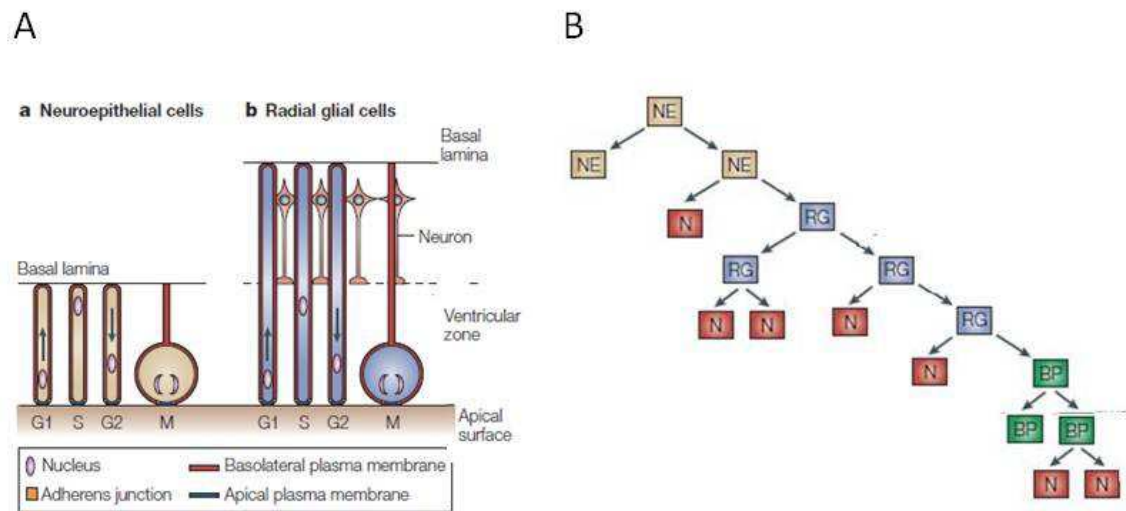
#### **1.1.3 Les Zones ventriculaire et sub-ventriculaire**

Les neurones pyramidaux, ou de projection, sont des neurones excitateurs utilisant le glutamate comme neurotransmetteur. Ils tiennent leur nom de leur forme pyramidale caractéristique. Leur mode de génération dans les zones ventriculaire (ZV) et sub-ventriculaire (ZSV) du pallium est intensément étudié. Ils peuvent provenir de trois types de progéniteurs différents : des cellules souches neuroépithéliales, des glies radiaires ou des progéniteurs intermédiaires.

#### **a- Les cellules souches neuroépithéliales**

Les cellules souches neuroépithéliales forment dans la ZV bordant les ventricules latéraux, le neuroépithélium d'aspect pseudo-stratifié par la juxtaposition étroite des cellules sans interposition de fibre. Ce sont des cellules polarisées selon un axe apico-basal, ancrées à la fois à la surface du ventricule et à la membrane piaie du cortex. Elles peuvent se diviser de façon symétrique pour générer deux cellules souches neuroépithéliales filles et ainsi étendre la population de progéniteurs. Lors de cette division le noyau se déplace de manière apico-basal. Tout d'abord il s'éloigne de la bordure de la ZV en phase G1, puis après la phase de mitose, atteint le point le plus éloigné du ventricule en traversant l'axe apico-basal entier de la cellule pour effectuer la réplication de l'ADN en phase S. Enfin, les deux noyaux générés regagnent la position d'origine près de la bordure du ventricule. Ce phénomène est appelé le mouvement nucléaire intercinétique (interkinetic nuclear movement) (Sidman *et al.*, 1959)(Figure4-A, Gotz,2005). La prolifération des cellules souches neuroépithéliales entraîne une augmentation de la surface et de l'épaisseur de la ZV. Dans un second temps, marquant le début de la neurogenèse, les cellules souches neuroépithéliales changent leur mode de division et débutent des divisions asymétriques. Ce changement a lieu approximativement vers E33 chez l'homme et E10 chez la souris. Alors qu'une des cellules filles reste une cellule souche neuroépithéliale, l'autre est une cellule post-mitotique neuronale ou une cellule de la glie radiaire (Figure4-B, Gotz,2005). Avec le début de la neurogenèse, les neuro-progéniteurs vont changer leurs caractéristiques en perdant des caractères de cellules épithéliales, notamment la perte des jonctions serrées inter-cellulaires et en acquérant des traits astrogliaux. Ainsi, le neuroépithélium va donner naissance à un nouveau type cellulaire

distinct mais apparenté : la glie radiaire (Bystron *et al.*, 2008; Gotz and Huttner, 2005; Kriegstein and Gotz, 2003).

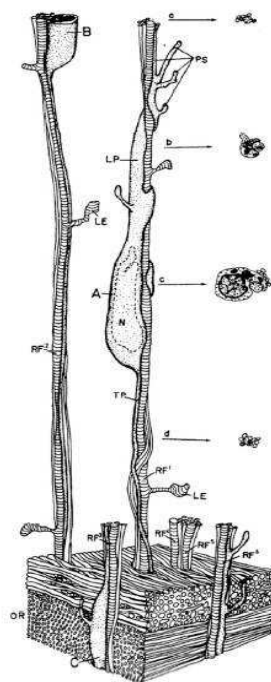


**Figure 4 : Caractéristiques de polarisation et mouvement nucléaire intercinétique des cellules neuroépithéliales et des glies radiaires et arbre de lignage de la neurogenèse.**

(A) Lors de la division cellulaire des cellules neuroépithéliales (a), le mouvement nucléaire intercinétique s'étend sur toute la hauteur du mur cortical alors que dans les cellules de la glie radiaire (b) il est restreint à la zone ventriculaire. (B) L'arbre de lignage montre une vue simplifiée des relations entre les cellules neuroépithéliales (NE), les glies radiaires (RG), les progéniteurs intermédiaires ou basaux (BP) et les neurones (N). (D'après Gotz et Huttner, 2005)

## b- La glie radiaire

Issues des cellules souches neuroépithéliales, les glies radiaires (GR), appelées aussi progéniteurs apicaux se situent également dans la ZV et possèdent une double fonction à la fois de progéniteurs neuronaux et de support de la migration radiale des neurones post-mitotiques générés. Extrêmement polarisées, elles sont ancrées à la surface du ventricule et étendent radialement un prolongement qui traverse l'épaisseur du mur cérébral jusqu'à la surface piale de l'isocortex appelée glia limitans et s'y attachent fermement grâce à une structure appelée pied de la glie. Ce sont ces longs prolongements qui guident les neurones vers la plaque corticale (PC) (Figure 5). Les glies radiaires expriment des marqueurs cellulaires réminiscents des cellules neuroépithéliales tels que la Nestine ainsi que des protéines spécifiques des astrocytes tels que la Vimentine, la Paired box 6



**Figure 5 : Schéma d'une glie radiaire et d'un neurone en migration.** (D'après Rakic, 2007)



protein (Pax6), la brain lipid binding protein (Blbp) et la glial fibrillary acidic protein (Gfap) chez l'homme et les primates (Kriegstein and Gotz, 2003). Elles peuvent entreprendre soit (i) une division symétrique générant deux nouvelles glies radiaires, ou (ii) une division asymétrique permettant la production d'une nouvelle glie radiaire et d'un neurone post-mitotique ou d'une glie radiaire et d'un progéniteur intermédiaire (Figure 4-B).

#### (i) Division symétrique

Les cellules de la glie radiaire entreprennent des mitoses successives qui permettent d'amplifier le pool de progéniteurs. Lors de ces divisions, elles maintiennent leur prolongement ancré à la surface piale permettant ainsi de maintenir la migration des neurones générés précocement. Les noyaux subissent également un mouvement nucléaire intercinétique, mais de moindre ampleur que celui des cellules souches du neuroépithélium (Figure 4-B). En effet le noyau restreint sa migration à la limite basale de la zone ventriculaire. La division symétrique est prédominante dans les stades précoces du développement (E13-E15 chez le rat).

#### (ii) Division asymétrique

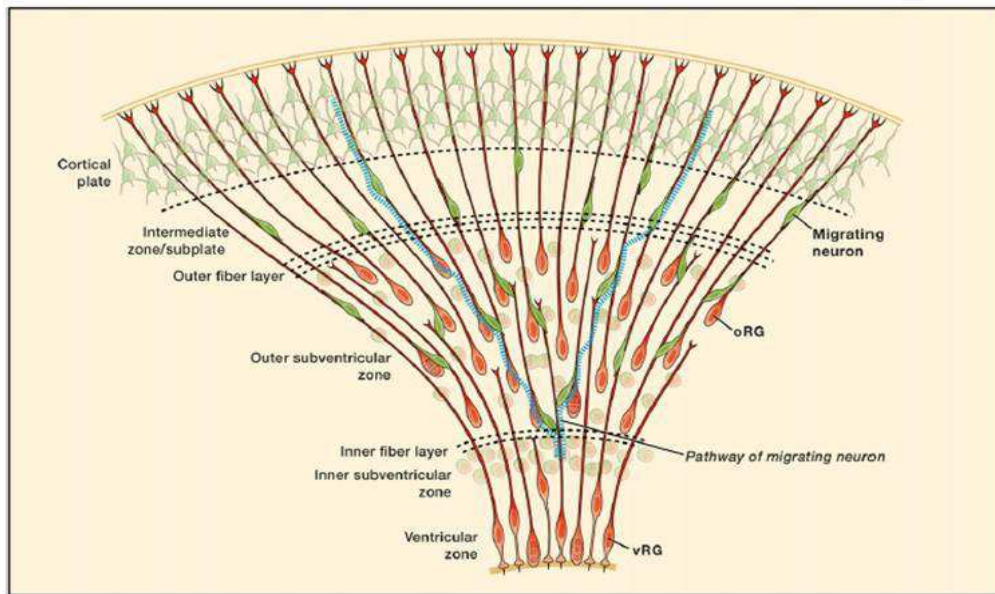
En 2004, Noctor et Coll. ont suivi le destin de 146 cellules neuronales de rat engendrées dans la ZV. Pour ce faire, ils ont injecté à E16 un rétrovirus exprimant la GFP (Green Fluorescent protein) dans les ventricules latéraux, puis suivi en vidéo microscopie les divisions et la migration des cellules fluorescentes du stade embryonnaire E17 à E19. Ils ont ainsi pu constater que près de 80% des divisions cellulaires entreprises à ce stade par les glies radiaires sont asymétriques. Elles génèrent deux cellules filles : une nouvelle glie radiaire et une autre cellule fille qui s'éloignent du ventricule. Ces divisions asymétriques peuvent être divisées en trois groupes. La majorité d'entre elles (66%) sont neurogéniques (la seconde cellule fille est un neurone pyramidal) alors que 7% peuvent être décrites comme progénitrices : la seconde cellule fille est elle aussi capable de ré-entrer dans le cycle cellulaire et se divise à nouveau. Dans ce cas là cette cellule fille prend une forme bipolaire, s'éloigne du ventricule, puis s'arrondit et se divise. Il s'agit d'un progéniteur intermédiaire (Figure 4-B). Enfin, dans 27% des cas, la division asymétrique est la dernière division neurogénique de la glie radiaire qui se détache alors du ventricule et s'éloigne de la ZV. Une fois éloignée de la ZV, la GR se différencie en astrocyte.

### **c- Les progéniteurs intermédiaires**

Quelques temps après le début de la neurogenèse, des cellules en division apparaissent à la limite basale de la ZV (Smart, 1973; The Boulder Committee, 1970). L'accumulation de ces progéniteurs intermédiaires (PI) ou « basaux » a créé un nouveau compartiment au dessus de la ZV que le comité Boulder a nommé « Zone Sub-Ventriculaire » (ZSV). Ces cellules ne sont pas attachées à la surface ventriculaire et ne subissent pas de mouvement intercinétique (Takahashi *et al.*, 1995b). Des études chez le rongeur ont montré que ces progéniteurs intermédiaires sont produits par les divisions asymétriques des glies radiaires et migrent par la suite dans la ZSV (Haubensak *et al.*, 2004; Miyata *et al.*, 2004). Les progéniteurs intermédiaires expriment des facteurs de transcriptions spécifiques tels que Tbr2, neurogenin 2 (Ngn2), Cut-like homeobox1 (Cux1) et Cux2 et n'expriment plus Pax6 et Glast (Gotz and Barde, 2005). L'extinction progressive de l'expression de PAX6 et l'initiation de l'expression de TBR2 caractérisent la transition de la glie radiaire vers le progéniteur intermédiaire (Englund *et al.*, 2005). Les divisions des progéniteurs intermédiaires semblent exclusivement symétriques. Elles peuvent donner dans 10% des cas deux nouveaux progéniteurs et dans la grande majorité (90%) des divisions, ce sont deux neurones pyramidaux qui sont produits (Noctor *et al.*, 2004)(Figure 4B).

### **d- Les GR basales**

Chez l'homme la ZSV a été divisée en deux sous structures la «ZSV interne » (ZSVI) proche de la ZV et la « ZSV externe » (ZSVE) située plus basalement. Des études ont montré que l'ZSVI contient des progéniteurs intermédiaires alors que l'ZSVE contient à la fois des progéniteurs intermédiaires (60% des progéniteurs de la ZSVE) et des glies radiaires basales appelées « GRb » (40%). Contrairement à celles bipolaires de la ZV, les GRb sont unipolaires : elles ne sont pas attachées à la surface du ventriculaire mais projettent tout de même leur prolongement jusqu'à la surface piale (Fietz *et al.*, 2010; Hansen *et al.*)(Figure 6).



**Figure 6 : Glies radiaires et glies radiaires basales du cortex humain en développement.**

Noter la représentation des glies radiaires basales (oRG) dont le corps cellulaire se situe dans la zone sub-ventriculaire externe (outer subventricular zone) et les pieds sont ancrés à la membrane piaie. (D'après Lui *et al.*, 2011)

De plus, les GRb entreprennent principalement des divisions asymétriques générant une nouvelle GRb et une autre cellule fille qui continuera elle aussi à se diviser et acquerra, après plusieurs divisions, le marqueur des progéniteurs intermédiaires TBR2 (Hansen *et al.*, 2010). Dans un premier temps considérés comme spécifiques des primates, les GRb ont aussi été retrouvés chez le furet (Fietz *et al.*, 2010) et en moins grand nombre dans la ZSV chez la souris (Shitamukai *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011).

### **e- Détermination du mode de division**

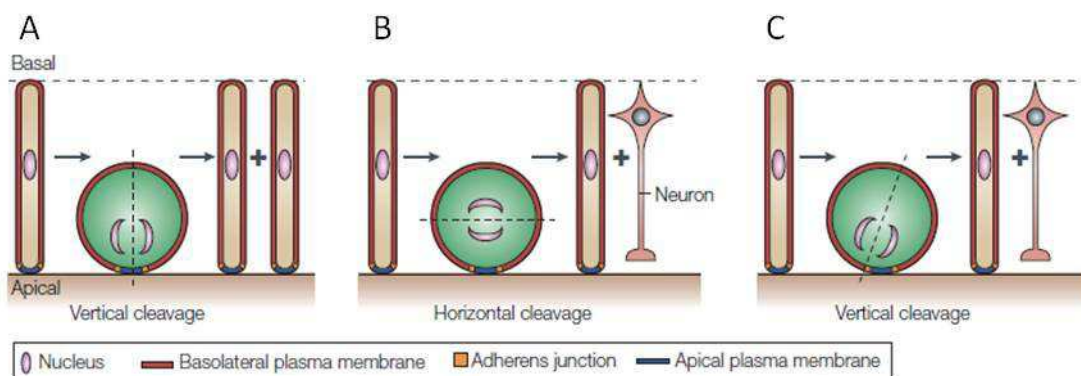
Plusieurs mécanismes cellulaires de détermination du type de division symétrique ou asymétrique ont été mis en évidence.

#### **(i) Plan du clivage mitotique**

La polarité apico-basale du progéniteur neuroépithélial ou de la glie radiaire joue un rôle important dans les divisions symétriques et asymétriques par la distribution égale ou inégale des composants des différents compartiments cellulaires aux deux cellules filles (Huttner and Brand, 1997). Il a été proposé qu'un plan de clivage mitotique radial (ou vertical) résulte en une division proliférative symétrique car les constituants à la fois basaux et apicaux de la cellule mère seraient divisés de façon égale entre deux cellules filles. En revanche, un plan de clivage parallèle (ou horizontal) à la surface du ventricule résulterait en une division

asymétrique, les constituants apicaux seraient alors hérités par une cellule fille, et les constituants basaux par une autre (Chenn and McConnell, 1995). Toutefois les plans de clivage horizontaux étant rares, ce concept a été modifié pour expliquer pourquoi des plans de clivages verticaux peuvent aussi donner des divisions asymétriques neurogéniques. Il démontre l'importance de la membrane plasmique apicale et de ses complexes associés qui peuvent, lors de la division cellulaire à plan de clivage vertical, soit être divisés en deux et transmis à deux cellules filles identiques, soit être entièrement transmis qu'à une des deux cellules et ainsi résulter en une division asymétrique (Kosodo *et al.*, 2004) (Figure7).

D'autres auteurs, dans une étude faite chez le rat, corrélient le plan de clivage du fuseau mitotique avec le type de progéniteurs en division plus qu'avec le type de cellules générées, associant le plan de clivage vertical aux glies radiaires et le plan horizontal aux progéniteurs intermédiaires (Noctor *et al.*, 2008). Toutefois, même si ces concepts sont encore discutés, il a été montré dans un modèle murin KO homozygote pour le gène *Lgn*, régulateur de la signalisation des protéines G, dans lequel le plan de division cellulaire des progéniteurs devient aléatoire, qu'il y a une augmentation du nombre de division asymétrique entreprise par la population de progéniteurs apicaux. Ces cellules de la glie radiaire diminuent rapidement dans la ZV et on peut observer leur présence anormale dans la ZSV et la ZI. Les auteurs observent le même phénomène de redistribution dans les couches plus basales pour la population de progéniteur intermédiaire. Ces résultats montrent que le contrôle du plan de clivage lors de la division des progéniteurs est nécessaire au maintien des populations de progéniteurs apicaux et basaux respectivement à la surface apicale de la ZV et dans la ZSV (Konno *et al.*, 2008).



**Figure 7 : Plan de clivage des divisions des cellules neuroépithéliales et des cellules de la glie radiaire.**

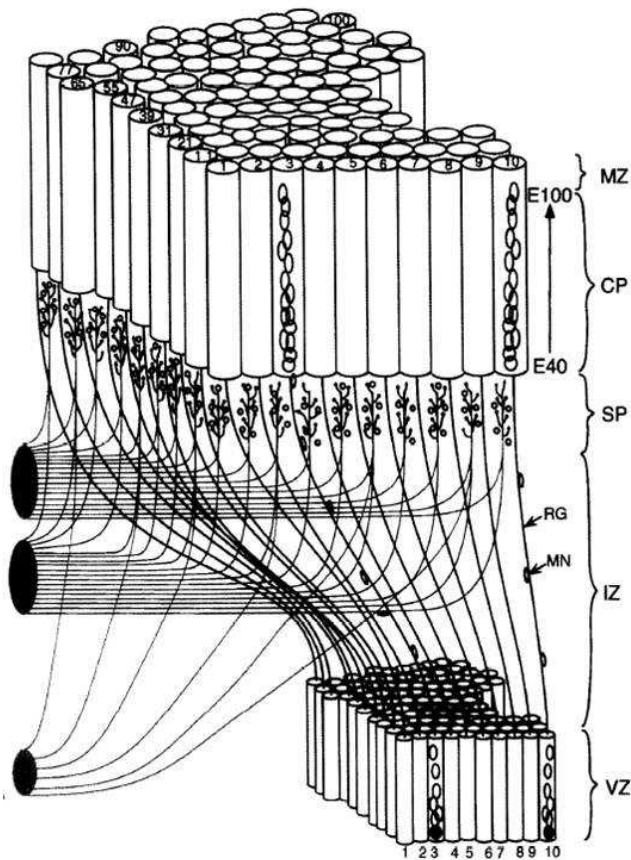
La figure résume la relation entre l'orientation du plan de clivage et les divisions symétriques prolifératives ou asymétriques neurogéniques. **(A)** Un plan de clivage vertical résulte en une division symétrique proliférative, **(B)** un plan de clivage horizontal entraîne une division asymétrique neurogénique. **(C)** Un plan de clivage vertical accompagné d'une transmission déséquilibrée de la membrane plasmique apicale résulte en une division asymétrique neurogénique. (D'après Gotz et Huttner, 2005)

## (ii) Contrôle du cycle cellulaire

Certaines études ont également associé le contrôle de la durée du cycle cellulaire au type de division entreprise par les progéniteurs neuronaux. Ainsi, une augmentation du temps de division cellulaire dans les progéniteurs neuroépithéliaux et les glies radiaires est corrélée à une augmentation du nombre de divisions neurogéniques chez la souris. Cette augmentation du cycle est due à un allongement de la phase G1 alors que les autres phases restent constantes (Takahashi *et al.*, 1995a). A l'inverse une diminution de 25% du temps de la phase G1 entraîne l'augmentation des divisions prolifératives des glies radiaires et des progéniteurs intermédiaires au détriment de la neurogenèse (Pilaz *et al.*, 2009). Des travaux sur des cellules souches neuronales de primates et de souris ont montré que la diminution de la phase G1 pourrait protéger les cellules contre les signaux extrinsèques promouvant la différenciation cellulaire (Fluckiger *et al.*, 2006). A l'inverse une phase G1 plus longue pourrait être une caractéristique d'une division différenciatrice facilitant l'intégration des signaux extrinsèques qui influencent le destin cellulaire. De plus la modulation de longueur de la phase G1 permettrait aussi de laisser le temps ou pas aux facteurs intrinsèques d'agir sur le destin des cellules, ainsi un cycle de division plus lent permettrait aux facteurs de transcription neurogéniques d'activer la différenciation. Ce concept appelé « hypothèse de la longueur du cycle cellulaire » a été proposé pour la première fois par Calegari et coll. en 2003 (Calegari and Huttner, 2003). Récemment, une étude chez la souris a montré que la phase S pouvait aussi jouer un rôle dans les divisions prolifératives ou neurogéniques. Les glies radiaires et les progéniteurs intermédiaires en division symétrique présentent une phase S plus longue que ceux engagés dans la différenciation (Arai *et al.*, 2011). Cet allongement permettrait aux progéniteurs en expansion de vérifier la qualité de l'ADN répliqué.

### **f- Progéniteurs et expansion corticale**

La taille et les circonvolutions du cortex cérébral ont augmenté massivement lors de l'évolution des mammifères. La première tentative de conceptualisation de ces évolutions fut présentée par P. Rakic dans l'hypothèse de l'« unité radiaire ». Selon cette hypothèse l'unité radiaire est composée d'une glie radiaire, l'épaisseur du cortex est déterminée par le nombre de neurones générés par unité radiale (ou colonne) alors que la surface de celui-ci est déterminée par le nombre d'unités (Figure 8 Rakic, 1995) (Rakic, 1995). A cette époque la glie radiaire n'était considérée que comme un échafaudage permettant la migration radiaire. La découverte du rôle de la glie radiaire comme précurseur neuronal, puis celles des progéniteurs intermédiaires et des GRb ont remis fortement en question cette théorie



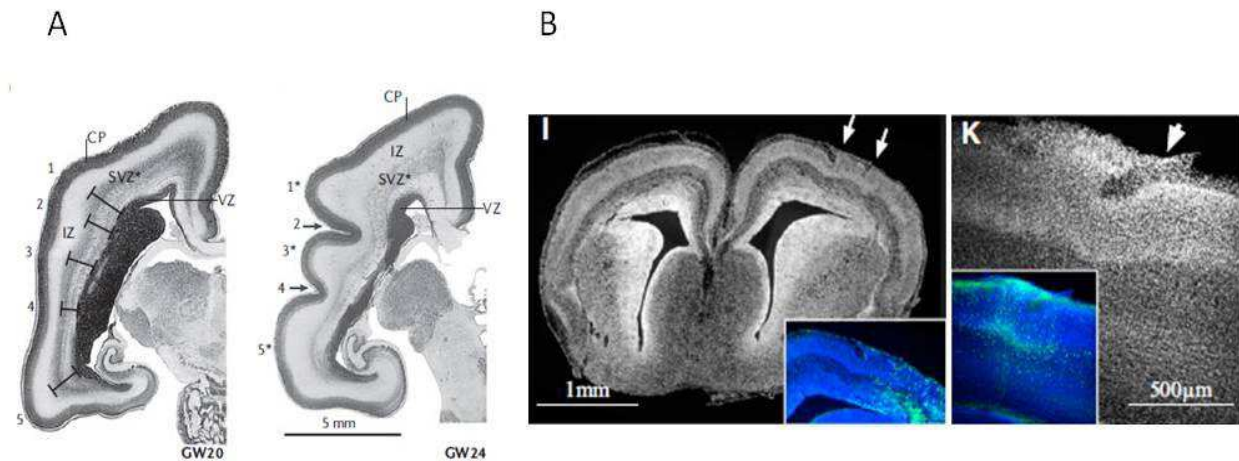
**Figure 8 : Représentation de l'hypothèse de l'unité radiaire.**

Selon cette hypothèse la surface du cortex est proportionnelle au nombre de glies radiaires (RG) et son épaisseur au nombre de neurones générés par celles-ci. Les neurones en migration (MN) migrent le long des processus des glies radiaires pour atteindre la plaque corticale (CP). (D'après Rakic *et al.*, 1995)

#### (i) Participation des progéniteurs intermédiaires

Une des hypothèses alternatives propose que l'expansion des progéniteurs intermédiaires chez les mammifères présentant un cortex gyrré a permis d'augmenter le nombre de neurones produits et ainsi d'augmenter la surface du cortex sans augmenter celle de la ZV. Ainsi si on compare la ZSV d'un cerveau non gyrré de rat à celle d'un cerveau gyrré de furet, on peut constater que la ZSV (comprenant les PI) du furet est relativement deux fois plus large que celle du rat (Martinez-Cerdeno *et al.*, 2006). De plus, parmi les mammifères la ZSV est plus large chez les primates et spécialement chez l'Homme, une espèce chez laquelle une grande expansion corticale a eu lieu (Smart *et al.*, 2002; Zecevic *et al.*, 2005). Une autre constatation anatomique conforte cette hypothèse : en observant la largeur de la ZSV dans un cortex embryonnaire de macaque ou d'humain, on peut constater qu'elle est relativement plus large dans les régions où un gyrus sera formé et plus fine dans les futures régions des sulci (Kriegstein *et al.*, 2006) (Figure 9-A).





**Figure 9 : Participation des progéniteurs intermédiaires et des glias radiaires basales à l'apparition de la gyration corticale.**

(A) Coupes coronales d'isocortex humain aux semaines de gestation 22 et 24. La taille de la zone sub-ventriculaire (SVZ) prédit les sites de formation des gyri et des sulci : elle est plus épaisse dans les régions qui forment un gyrus et plus fine dans celles qui présentent un sulcus. (D'après Kriegstein *et al.*, 2006) (B) Coupes coronales de cerveau de souris au jour embryonnaire 16 (I) et post-natal 5 (K) après électroporation *in utero* d'un ARNsh dirigé contre Trnp1. L'inactivation de Trnp1 entraîne l'augmentation des populations de progéniteurs intermédiaires et de glias radiaires basales ainsi que la formation de gyration corticale (flèches) visibles aux stades embryonnaires et post-nataux. (D'après Stahl *et al.*, 2013)

## (ii) Participation des GRb

Les GRb sont très abondants dans les cerveaux gyrés mais rares dans les cerveaux murins lisses (Reillo and Borrell, 2012; Shitamukai *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). Leur ancrage à la surface piaie mais non à la surface ventriculaire est considéré comme un moyen d'introduire de la courbure dans le cortex cérébral en développement. Par conséquent, une nouvelle hypothèse propose que la taille du cortex et ses repliements puissent dépendre non seulement de l'abondance relative des glias radiaires et des progéniteurs intermédiaires, mais aussi de la prolifération des GRb. La preuve expérimentale de cette théorie fut donnée récemment grâce à des modèles transgéniques de souris naturellement lissencéphale et de furet qui présentent un cortex plissé, permettant le contrôle de l'expansion des progéniteurs intermédiaires ou des GRb *in vivo*. Les auteurs ont pu montrer que l'expansion des progéniteurs intermédiaires chez la souris entraîne une mégaencéphalie mais pas de repliement du cortex alors que l'expansion des GRb a pour conséquence l'apparition de circonvolutions supplémentaires chez le furet. Dans les deux cas la structure corticale est préservée (Nonaka-Kinoshita *et al.*, 2013).

Une autre étude récente de l'équipe de M. Gotz a exploré le modèle murin de sous expression par ARNsh de Trnp1, un facteur de transcription. Il présente notamment une augmentation importante des GRb et des PI au détriment des GR et l'apparition de gyrations corticales observables à des stades embryonnaires et post-nataux (Figure 9-B). TRNP1 est aussi exprimé dans le cerveau en développement humain. De façon intéressante, il est exprimé plus fortement dans les zones germinales des régions qui n'entreprennent que peu

de gyration telles que les gyri précentraux et parahippocampiques alors qu'il est peu exprimé dans les zones germinatives des régions à forte gyration telles que les lobes temporaux et occipitaux, faisant donc de TRNP1 un facteur clé inhibiteur du contrôle de la gyration (Stahl *et al.*, 2013).

Ces résultats montreraient donc des rôles spécifiques et distincts des deux types de progéniteurs durant le développement cortical : les progéniteurs intermédiaires permettant l'expansion du nombre de neurones pyramidaux qui migrent le long des processus des glies radiaires basales qui eux, permettent l'apparition de la gyration du cortex au cours du développement.

## 1.2 La migration neuronale

Une fois générés dans les zones de prolifération, les neurones corticaux doivent se diriger, parfois sur de grandes distances, vers leurs places définitives dans les couches du cortex. Provenant de deux régions différentes les interneurones et les neurones pyramidaux vont entreprendre deux types de migrations distinctes : une migration tangentielle pour les premiers et une migration radiaire pour les seconds.

### 1.2.1 La migration tangentielle

#### a- Patron de migration

Les interneurones en migration quittant le subpallium en destination du pallium suivent des routes bien définies. Dans un premier temps, en quittant principalement l'éminence ganglionnaire médiane, ils se dirigent vers le cortex en se séparant en deux populations afin de contourner le striatum en développement et ainsi s'intégrer dans le cortex par les zones superficielles ou plus profondes de la structure corticale en évitant dans un premier temps la plaque corticale (Marin *et al.*, 2000) (Figure 10-A). Les neurones migrant superficiellement vont migrer dans la zone marginale ou la sous plaque (Lavdas *et al.*, 1999). De l'autre côté les neurones en migration plus profonde dans le cortex traversent la couche profonde de la zone intermédiaire (Denaxa *et al.*, 2001; Lavdas *et al.*, 1999), puis au cours du développement occupent une place plus profonde dans la zone sous ventriculaire (Del Rio *et al.*, 1992; Marin and Rubenstein, 2001). Une fois dans le cortex les interneurones peuvent alors se réorienter pour migrer de façon radiaire afin de rejoindre leur destination finale dans les différentes couches de la plaque corticale (Figure 10-B).



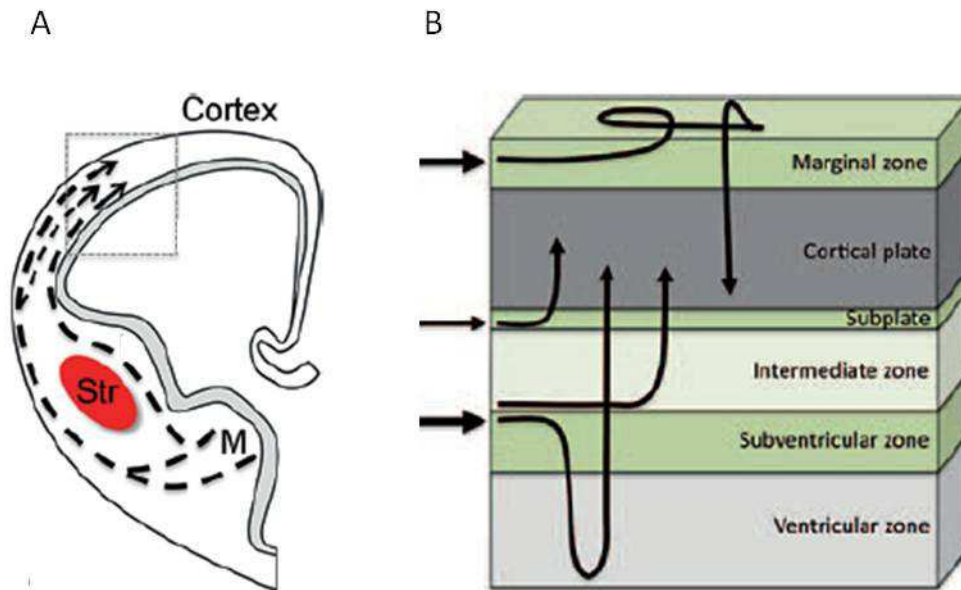


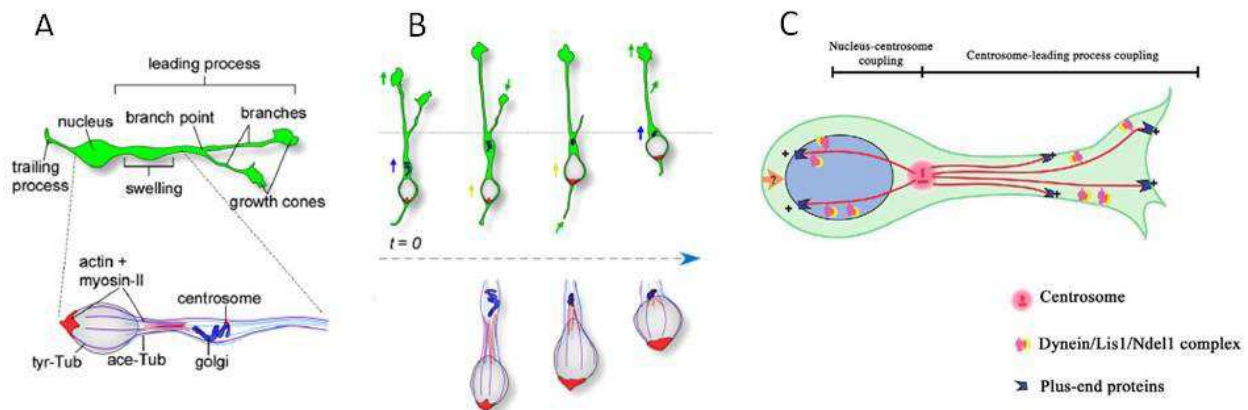
Figure 10 : Trajets migratoires des interneurones.

(A) Les interneurones générés dans l'éminence ganglionnaire médiane (M) migrant tangentiellement vers le cortex en évitant le striatum (STR). (B) Une fois présent dans le cortex, les interneurones migrent par trois principales voies : par la zone marginale aux stades précoces, par la zone intermédiaire ensuite et par la sous-plaque lors des stades tardifs. (D'après Faux *et al.*, 2012)

## b- Morphologie et mouvement de l'interneurone en migration

L'interneurone en migration acquiert une morphologie polarisée stéréotypée. Il projette en avant un processus appelé « processus guide » qui peut arborer un nombre de branchements variables au cours de la migration à l'extrémité desquels un cône de croissance se déploie. De l'autre côté du corps cellulaire, le neurone possède un processus postérieur. On peut observer à la base du processus antérieur, en avant du noyau, un renflement contenant les petits organelles (Figure 11-A). La migration de ces neurones s'effectue par une succession d'événements stéréotypés bien décrite permettant la translocation du soma.

Tout d'abord, l'interneurone va projeter plusieurs branchements du processus guide, puis en sélectionner un seul orienté vers le signal attractif alors que les autres vont commencer à se rétracter. En parallèle un renflement se forme en avant du noyau contenant le centrosome et l'appareil de golgi, le noyau migre alors en avant pour rejoindre le renflement. Le neurone recommence ce cycle en étendant son processus antérieur et reformant différents branchements (Bellion *et al.*, 2005) (Figure 11-B). La répétition de ces deux événements couplés est responsable de l'aspect saltatoire de la migration des interneurones.



**Figure 11 : Morphologie de l'interneurone en migration et nucléokinèse.**

(A) Représentation des structures d'un interneurone en migration. (B) Cycle migratoire d'un interneurone en migration et mouvement du noyau et du centrosome durant la migration. (D'après Valiente et Marin, 2010) (C) Acteurs moléculaires permettant aux microtubules de promouvoir le mouvement du noyau et du centrosome lors de la migration neuronale. (D'après Tsai *et al.*, 2005)

Cette nucléokinèse et le mouvement du centrosome dépendent fortement d'un réseau de microtubules qui forment une cage entourant le noyau et qui s'étend dans le centrosome et le processus antérieur. Les microtubules formant la cage entourant le noyau sont fortement tyrosinés et donc très dynamiques alors que ceux présents en antérieur du noyau et reliés au centrosome sont acétylés et donc plus stables (Figure 11-A).

### c- Régulation moléculaire de la nucléokinèse

Parmi tous les acteurs de la régulation de la nucléokinèse (notamment les kinases Cdc42 et FAK) on retrouve les protéines Lis1 et Doublecortine responsables de MDC chez l'homme.

Le complexe protéique lié aux MT Nde1/Lis1/Dynéine joue également un rôle prépondérant dans la nucléokinèse. La protéine Lis1 forme un complexe avec la protéine motrice Dynéine sous le contrôle de Nde1. Dynéine est un complexe protéique qui, grâce à son activité ATPasique, convertit l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP en un déplacement vers l'extrémité (-) des MT (Conde and Caceres, 2009). Des travaux récents ont montré que Lis1 permet à Dynéine de rester lié aux MT durant de longues périodes même pendant l'hydrolyse de l'ATP qui devrait normalement entraîner un signal de détachement de la protéine des MT (Huang *et al.*, 2012). La protéine Nde1, quant à elle, facilite l'interaction entre Lis1 et Dynéine. Elle permet aussi le recrutement de Lis1 et Dynéine aux extrémités (+) des MT ainsi qu'au centrosome (Guo *et al.*, 2006; Shu *et al.*, 2004). Différents travaux ont montré que le complexe Nde1/Lis1/Dynein est impliqué dans le maintien du couplage entre le noyau et le centrosome via les MT de la cage périnucléaire. La Dynéine peut également se fixer aux membranes plasmidique et nucléaire constituant ainsi des points d'ancrages pour les MT.

Deux modèles ont été proposés pour le rôle de Dynéine dans la nucléokinèse. Dans le premier, les protéines Dynéines ancrées dans la membrane plasmique du processus guide tirent sur les MT attachés au centrosome et au noyau, dans le deuxième, l'activation des Dynéines ancrées dans la membrane nucléaire entraîne une pression sur le noyau qui se déplace en direction du centrosome (Figure 11-C).

De façon cohérente, la perte de fonction de Lis1 s'accompagne d'une absence de mouvement du noyau et du centrosome, de plus l'inactivation de Dynéine induite par ARN interférent dans des neurones en migration induit un arrêt de la progression du centrosome montrant donc l'importance de ce complexe dans la nucléokinèse (Tsai *et al.*, 2007).

La protéine Doublecortine (Dcx) peut jouer également un rôle dans ces phénomènes de part sa fonction de stabilisatrice des MT et de son emplacement sur le réseau de MT entre le noyau et le centrosome. En effet, la surexpression de Dcx a pour conséquence une augmentation du couplage entre le noyau et le centrosome, alors que le modèle murin KO de Dcx présente un défaut de dynamique de la nucléokinèse des interneurones en migration (Bai *et al.*, 2003) (Kappeler *et al.*, 2006; Koizumi *et al.*, 2006a).

Toute fois, il est peu probable que les forces de tractions et de pression des MT soient suffisantes à la nucléokinèse. Plusieurs études ont montré un enrichissement en F-actine et en Myosine II à l'arrière du noyau des neurones en migration et qu'un blocage de l'activité ATPasique de la Myosine II empêche la nucléokinèse. Suggérant que la contraction des fibres d'acto-myosines pousse le noyau vers l'avant (Bellion *et al.*, 2005; Schaar and McConnell, 2005).

L'importance de ces acteurs moléculaires du réseau de MT dans ces processus de migration tangentielle a été également confirmée par certaines études montrant que la perturbation de sa dynamique a des conséquences sur le processus « guide » et d'orientation de la migration. Ainsi la déplétion de protéines associées aux microtubules telles que Lis1 (Gopal *et al.*, 2010) et Doublecortine (Dcx) (Friocourt *et al.*, 2007; Kappeler *et al.*, 2006) ou de leurs régulateurs en amont p35/Cdk5 (Rakic *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2004) entraîne des défauts de branchement et d'orientation des neurones en migration.

### 1.2.2 Migration radiaire

Une fois générés dans les ZV ou ZSV, les neurones pyramidaux entreprennent une migration perpendiculaire à la surface du ventricule appelée migration radiaire. Ils prennent pour matrice les prolongements de la glie radiaire qui vont leur permettre de rejoindre leur destination finale dans la plaque corticale.

Deux types de migrations radiaires sont entrepris par les neurones pyramidaux : (i) la translocation nucléaire durant les étapes précoces du développement, puis (ii) une migration plus complexe en quatre étapes effectuées par la majorité d'entre eux.

### a- La translocation nucléaire.

Ce type de migration radiaire est entrepris par les neurones générés précocement au stade E12-E13 du développement chez la souris alors que le mur cortical est encore suffisamment fin pour que les neurones puissent étendre leur processus antérieur jusqu'à la surface piale et puissent s'y ancrer. Le noyau entreprend alors un mouvement continu et régulier en direction de l'extrémité apicale du neurone et ainsi raccourcit le processus antérieur ancré à la surface piale, jusqu'à atteindre la partie supérieure du mur cortical et former ainsi la pré-plaque. Ce mode de migration est aussi appelé translocation somale car c'est le soma dans sa totalité qui migre ainsi et pas seulement le noyau. Il s'agit d'un mode de migration indépendant de la glie radiaire (Figure 12) (Book *et al.*, 1991; Brittis *et al.*, 1995; Morest, 1970; Nadarajah *et al.*, 2001).

Avec l'épaississement du mur cortical au cours du temps, les neurones sont dans l'incapacité d'étendre un processus jusqu'à la surface piale et ne peuvent donc plus utiliser la translocation nucléaire pour rejoindre la plaque corticale. Ils se servent alors des processus de la glie radiaire pour guider leurs mouvements lors de leur migration par locomotion (Figure 12).

Très peu de cellules neuronales vont simplement directement migrer de la ZV/ZSV vers le cortex après la neurogenèse. A l'inverse, cette migration va se faire en quatre différentes étapes pendant lesquelles les cellules vont entreprendre des changements morphologiques drastiques.

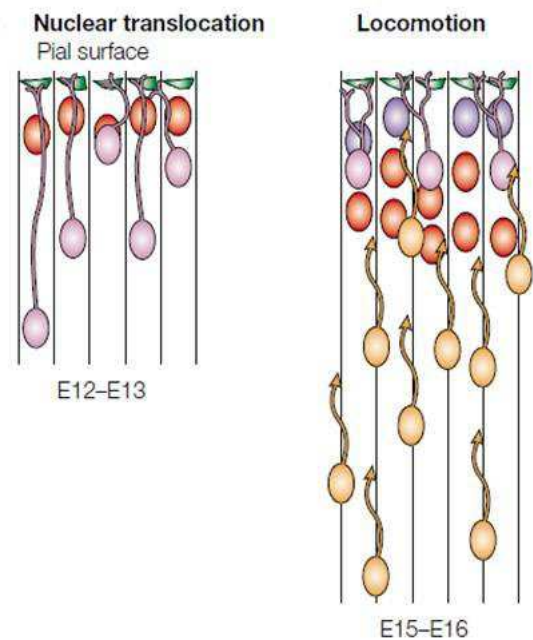


Figure 12 : Modes de migration des neurones pyramidaux.

(D'après Gupta *et al.*, 2002)

### b- La migration en quatre étapes

Les étapes de cette migration ont été décrites par Noctor et coll. en 2004 grâce aux expériences décrites précédemment (voir section 1.1.3-b-(ii)) (Figure 13-A,-B)

#### (i) Initiation de la migration

Dans un premier temps les neurones nouvellement générés par la glie radiaire adoptent une forme bipolaire. Ils vont rester environ 10h dans la ZV chez la souris avant de rejoindre la partie apicale de la ZSV (Figure 13-A,-B).

## (ii) Phase multipolaire

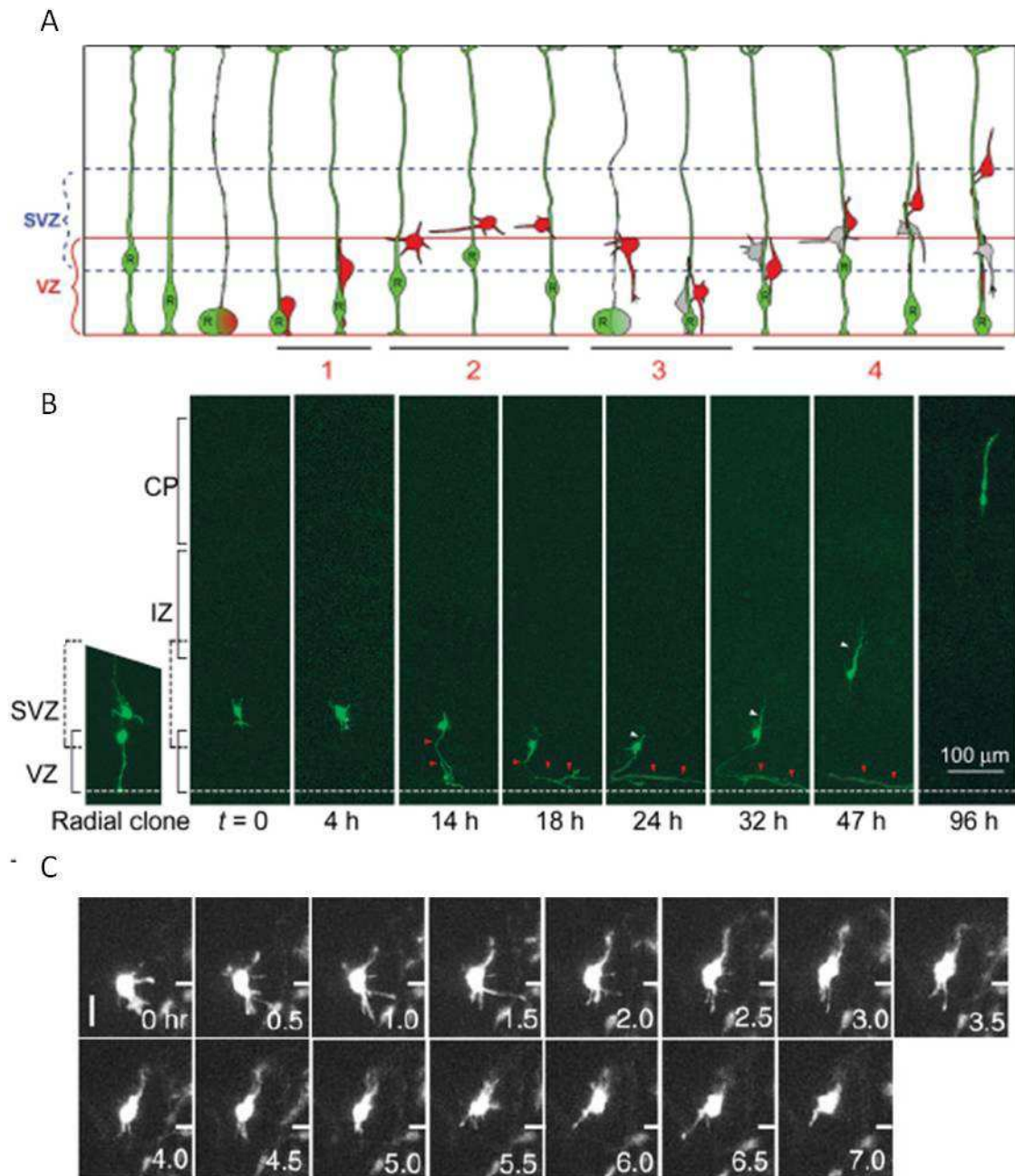
Arrivés dans la ZSV, ils arrêtent alors de migrer et acquièrent une morphologie multipolaire. Les neurones restent à ce stade entre 24 et 36h (Noctor *et al.*, 2004; Tabata and Nakajima, 2003) créant ainsi une nouvelle zone appelée ZAM (Zone d'Accumulation Multipolaire). Ils ont alors un comportement très dynamique, changeant fréquemment d'orientation et projetant et rétractant de nombreux processus. (Figure 13-C)

En 2003, Tabata et Nakajima ont montré qu'environ 80% des cellules multipolaires générées dans la ZV par les GR et s'accumulant dans la ZAM sont capables de se déplacer tout en continuant à projeter et rétracter des processus. Ces cellules bougent lentement dans différentes directions, et changent de direction fréquemment, tout en tendant à se diriger vers la surface piaie. Leurs mouvements sont très irréguliers car les cellules peuvent rester immobiles pendant des heures entre deux phases de migration, ainsi alors que leur vitesse moyenne quand elles sont en migration est de 4,4 $\mu$ m/h, la distance moyenne parcourue par heure n'est que de 2,2 $\mu$ m.

Ils ont pu également observer que les cellules multipolaires effectuent des sauts tangentiels. Un des processus tangentiels s'épaissit transitoirement et le corps cellulaire transloque dans la direction de celui-ci. Finalement la cellule reprend sa forme multipolaire d'origine (Tabata and Nakajima, 2003).

De part le très grand nombre de neurones passant par le stade multipolaire, ce mode migratoire transitoire peut jouer un rôle important dans le développement du cortex.

Alors que la translocation nucléaire et la locomotion sont restreintes dans leur expansion tangentielle soit par l'ancrage à la surface piaie des neurones pour la première, soit par la nécessité de suivre la GR pour la seconde; la migration multipolaire permet aux neurones pyramidaux d'effectuer une migration tangentielle (Figure 13-C). On peut rapprocher l'extension et la rétraction dynamique des multiples processus au phénomène de branchement du processus guide des interneurones lors de la migration tangentielle et donc à la recherche de signaux attractifs, qui une fois repérés par le neurone, promeuvent la reprise de la migration tangentielle.



**Figure 13 : Migration radiaire en quatre étapes.**

**(A)** Schéma représentant la migration en quatre étapes d'un neurone pyramidal. **(B)** Observation par vidéo-microscopie d'un neurone pyramidal au cours de sa migration, de sa génération par la glie radiaire à son arrivée dans la plaque cortical. (D'après Noctor *et al.*, 2004). **(C)** Observation par vidéo-microscopie d'un neurone pyramidal en migration pendant la phase multipolaire. (D'après Tabata *et al.*, 2003).

### (iii) Phase rétrograde

Dans un troisième temps les cellules vont étendre un processus en direction de la surface du ventricule et le corps cellulaire effectuer un mouvement vers le ventricule. Ce mouvement rétrograde concerne environ 60% des cellules chez la souris d'après Noctor et coll., 2004 et



est entrepris également par les neurones générés par les progéniteurs intermédiaires dans la ZSV. Les cellules contactent la surface du ventricule et gardent ce contact environ dix heures avant de reprendre leur migration en direction de la plaque corticale. (Figure 13-A,-B)

#### (iv) Migration radiaire par locomotion

Pour reprendre leur migration vers la PC, les neurones adoptent alors de nouveau une morphologie bipolaire en inversant leur polarité et en étendant un processus principal en direction de la surface piaie, l'ancien processus guide en direction du ventricule devient le processus postérieur (Figure 13-A,-B). Le processus de migration par locomotion est intermittent, les phases d'expansion du processus antérieur alternent avec celles d'avancées du noyau et du soma.

Les neurones générés dans la ZV par les GR migrent plus rapidement que ceux générés dans la ZSV par les PI ( $6,4 \pm 0,7 \mu\text{m/h}$  versus  $4,1 \pm 0,6 \mu\text{m/h}$ ) (Noctor *et al.*, 2004).

Le nouveau processus postérieur du neurone en migration s'allonge considérablement en poussant de façon tangentielle dans la ZV. Ces prolongements sont considérés comme des axones de part leur morphologie et leur trajectoire. Beaucoup des neurones en début de migration possèdent ce type de prolongements axonaux et vont les maintenir dans la ZV tout au long de leur migration. Ces axones vont se retrouver ultérieurement dans la matière blanche (Figure 13-B). Ce mode de pousse axonal se différencie de celui des interneurones qui n'étendent leurs axones qu'après avoir atteint leur position définitive dans le cortex.

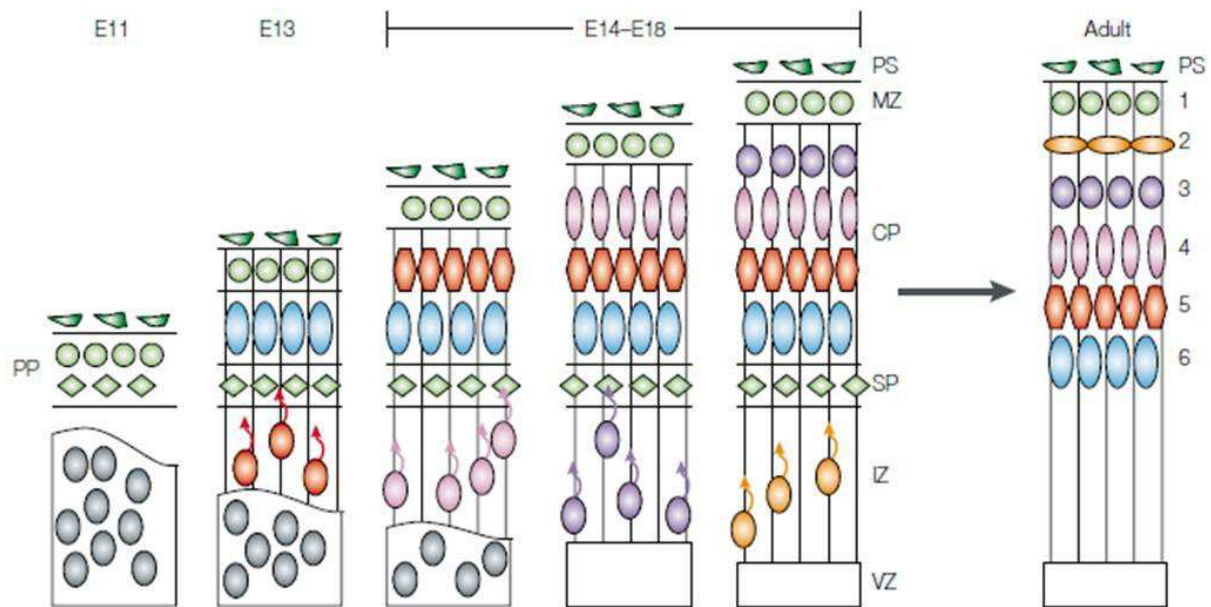
Une fois atteint les couches superficielle du cortex, les processus guides s'ancrent à la surface piaie, puis les neurones effectuent une translocation nucléaire et se détachent de la glie radiaire (Nadarajah *et al.*, 2001).

### c- Migration inside-out et mise en place de la lamination corticale

Le cortex des mammifères est constitué de six couches de neurones qui ont des morphologies et des spécificités fonctionnelles distinctes. La lamination de cette structure est intimement liée à la migration radiaire des neurones pyramidaux.

Chez la souris à E11, la première vague de neurones générés sortent de la ZV et forment la première couche neuronale appelée la pré-plaque. Vers E13, une seconde vague de neurones va diviser la pré-plaque en deux structures : la zone marginale superficielle et la sous plaque plus profonde (SP). La couche créée entre ces deux structures est appelée la plaque corticale (PC). La zone entre la ZV et la PC, qui ne contient pas de progéniteurs neuronaux ni de neurones en position définitive est appelée la zone intermédiaire (ZI). Entre E14 et E18 des vagues successives de neurones pyramidaux vont quitter la ZV, rejoindre la PC pour former les différentes couches corticales en dépassant toujours les neurones ayant

migrés précédemment. Ainsi, les neurones générés précocement se retrouvent dans les couches profondes du cortex alors que les neurones générés tardivement se retrouvent dans les couches superficielles (Angevine and Sidman, 1961). Ce phénomène de lamination séquentielle est qualifié d' « inside-out » en anglais (Figure 14).



**Figure 14 : Formation des couches corticales.**

Etapes développementales importantes de la formation des couches corticales chez la souris illustrant le mode de migration « inside-out » des neurones pyramidaux. (d'après Gupta *et al.*, 2002).

Il est considéré que les interneurones s'intègrent également dans les différentes couches du cortex par le même mécanisme de migration « inside out » avec les interneurones précoces occupant les couches profondes et les interneurones tardifs se situant dans les couches superficielles (Lopez-Bendito *et al.*, 2004; Rakic *et al.*, 2009; Valcanis and Tan, 2003). Néanmoins, il existe des exceptions à cette règle, les interneurones précoces occupent majoritairement la couche V comme attendu, mais on les retrouve aussi de façon minoritaire dans les couches II et III (Yozu *et al.*, 2004). De plus il a été montré chez le rat que les interneurones exprimant la parvalbumine ne suivent pas ce schéma alors que les interneurones calretinine positifs suivent à l'inverse un schéma de migration « outside-in » (Rymar and Sadikot, 2007). Il apparaît clairement que le site de destination des interneurones ne dépend pas seulement du moment auquel ils ont été générés mais aussi de leurs types et de leur lieu d'origine.

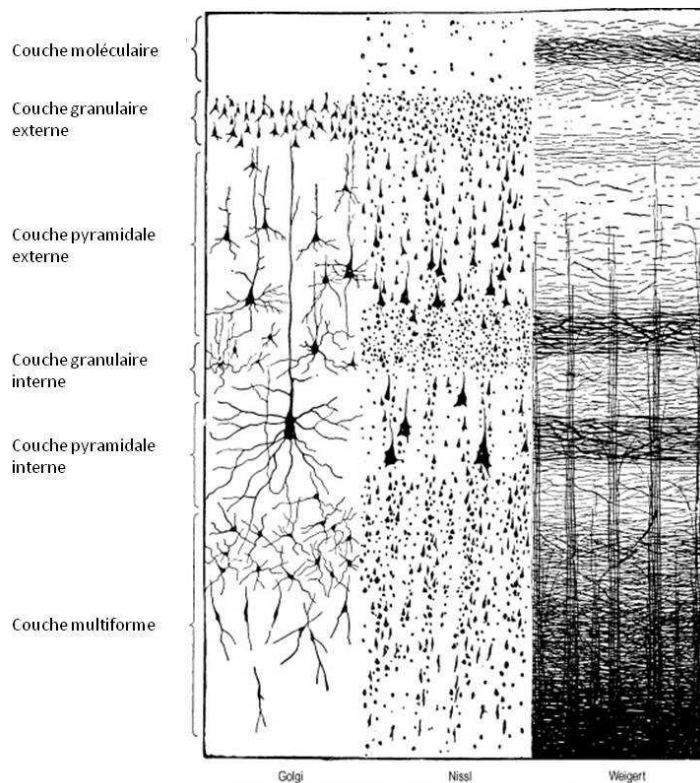


## 1.3 La différenciation neuronale

### 1.3.1 Organisation corticale

Le cortex mature chez l'homme et chez la souris est organisé en six couches (Figure 15):

- La couche I ou couche moléculaire, pauvre en cellules nerveuses, elle est constituée surtout de cellules gliales et de fibres nerveuses ayant un trajet parallèle à la surface corticale.
- La couche II ou couche granulaire externe, essentiellement constituée de petits neurones inhibiteurs.
- La couche III ou couche pyramidale externe, contient la majorité des neurones pyramidaux. Les axones de ces neurones forment les fibres intra et interhémisphériques (ou commissurales) tandis que les dendrites apicales atteignent la couche moléculaire.
- La couche IV ou couche granulaire interne, est formée de petits neurones non pyramidaux, représentés essentiellement par des cellules étoilées.
- La couche V ou couche pyramidale interne, contient des neurones pyramidaux dont les dendrites apicaux se projettent soit dans la couche I, soit dans la couche IV.
- La couche VI ou multiforme est la source principale de neurones qui se projettent dans le thalamus. Elle est également à l'origine des fibres commissurales et des fibres d'association.



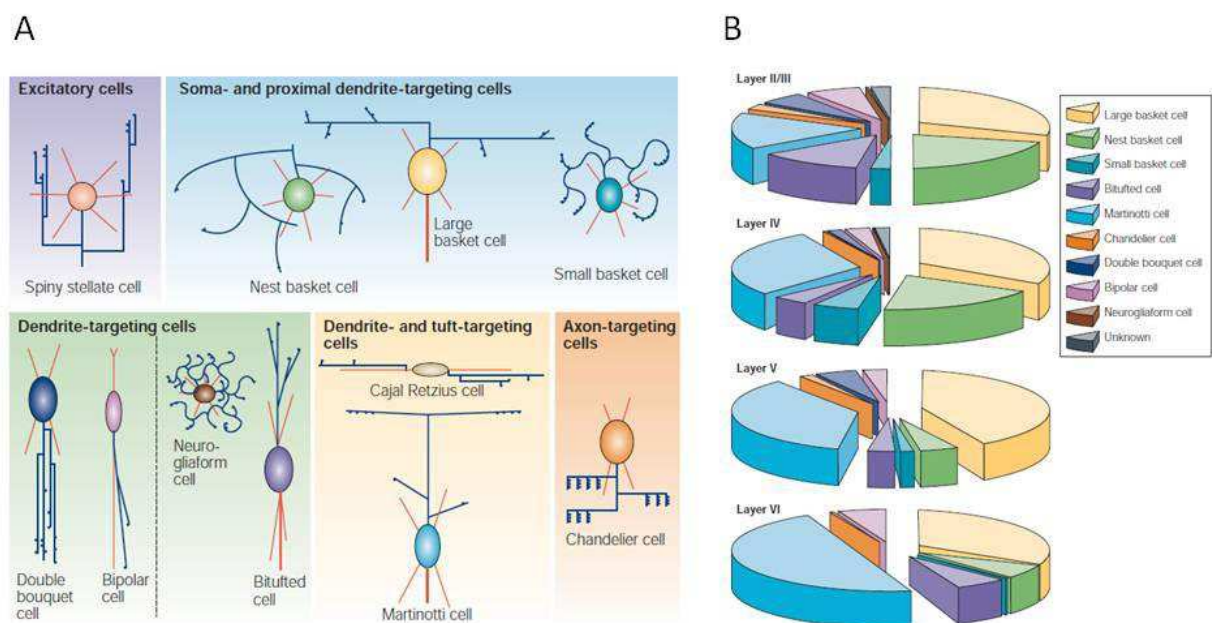
**Figure 15 : Les couches du cortex cérébral humain.**

Disposition des éléments cellulaires révélés par des colorations au Golgi (imprégnant les neurones en totalité), au Nissl (corps cellulaire) et au Weigert (fibres nerveuses). (D'après Gray's anatomy, 39<sup>ème</sup> édition)

### 1.3.2 Les interneurones

La différenciation des interneurones se fait dans le cortex après leur arrivée à destination. Les interneurones forment alors principalement de nombreuses connexions synaptiques avec les neurones avoisinants formant les microcircuits neuronaux locaux.

Après maturations, ils manifestent des traits communs tels que l'expression du GABA, l'extension de dendrites sans épines ou la capacité de recevoir des synapses à la fois inhibitrices et excitatrices. A l'opposé, ils développent surtout des caractéristiques spécifiques à des niveaux morphologiques, moléculaires et synaptiques. Ainsi, si on divise les interneurones du point de vue de leurs morphologies dendritique, axonale et somatique, on peut distinguer dix groupes (dont un excitateur). Ces groupes sont plus ou moins enrichis suivant les espèces, les régions du cerveau et dans les différentes couches corticales (Callaway, 1998; DeFelipe, 2002; Jones, 1975; Markram *et al.*, 2004) (Figure16).



**Figure 16 : Diversité des interneurones**

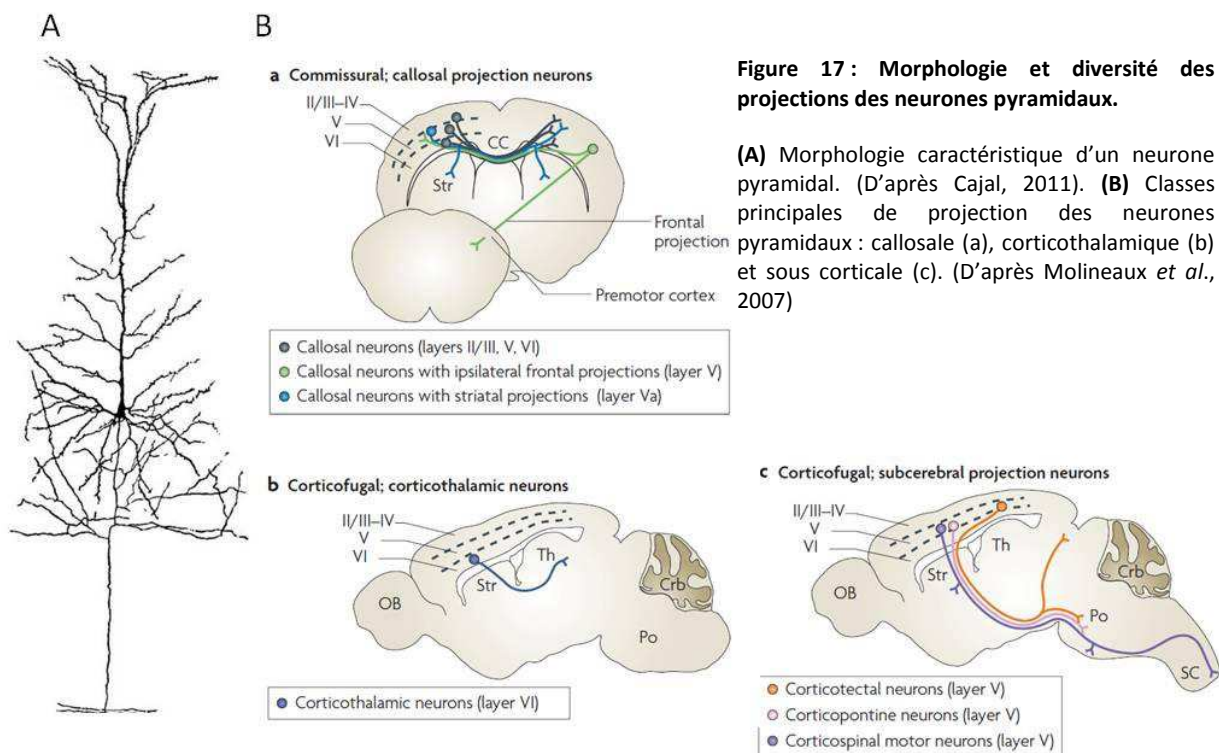
**(A)** Schéma résumant les principaux groupes anatomiques d'interneurones. **(B)** Enrichissement des différents types d'interneurones dans les couches corticales de rat. (D'après Markram *et al.*, 2004)

Ces groupes morphologiques expriment des compositions variées de neuropeptides et de canaux ioniques créant ainsi une diversité neuronale très importante aux caractéristiques électrophysiologiques différentes. Ainsi on peut dénombrer environ 50 types électro-anatomiques d'interneurones permettant un nombre gigantesque de types de connexion interneurones - neurones pyramidaux ou entre interneurones différentes (Markram *et al.*, 2004).

### 1.3.3 Les neurones pyramidaux

Arrivés dans leurs couches de destination du cortex, les neurones pyramidaux vont déployer leur réseau dendritique et acquérir leur morphologie typique en forme de pyramide (Figure17-A). Leurs axones continuent à s'étendre pour former des connexions avec d'autres régions du cortex ou des régions extra-corticales. Selon ce critère hodologique, on peut décrire trois classes principales de neurones de projection (Figure17-B):

- les neurones de projection callosale : ce sont des neurones de petite ou moyenne taille présents dans les couches II ,III,V et VI qui projettent un axone à travers le corps calleux pour rejoindre les couches corticales de l'autre hémisphère. Ces neurones peuvent aussi entreprendre des doubles projections avec d'autres aires striatales ou corticales.
- les neurones corticothalamiques : principalement présents dans la couche VI et en plus petit nombre dans la couche V, ces neurones projettent leur axones vers différents noyaux du thalamus.
- les neurones de projection sous-corticale : disposés dans la couche V, ces gros neurones pyramidaux étendent leurs axones vers le tronc cérébral et la moelle épinière. Parmi eux, les neurones corticotectaux projettent premièrement vers les colliculi puis secondairement dans les pons, les neurones corticopontiques projettent directement dans les pons et enfin les neurones moteurs corticospinaux dont les projections atteignent la moelle épinière (Molyneaux *et al.*, 2007).



Des études d'expression comparative des neurones pyramidaux des différentes couches corticales ont été entreprises avec l'aide de co-immunomarquages ou de souris transgéniques exprimant la GFP sous le contrôle de promoteurs spécifiques des couches et des lignées neuronales. Elles ont mis en évidence un grand nombre de gènes ayant des expressions différentielles dans les différentes couches du cortex ou les sous types de neurones pyramidaux et permettent ainsi de nouvelles classifications de ces neurones. Par exemple les gènes *Cux1*, *Cux2* et *Tbr1* sont fortement exprimés dans les couches II/III et IV (Nieto *et al.*, 2004; Zimmer *et al.*, 2004), mais *Tbr1* est aussi fortement exprimé par les neurones à projection corticothalamique de la couche VI (Hevner *et al.*, 2002; Hevner *et al.*, 2001). A l'inverse, *S100A10* est spécifique des neurones à projection sous-cérébrale de la couche V de l'isocortex mais disparaît aux stades post-nataux (Arlotta *et al.*, 2005) (Figure 17-C, Shoemaker).

Ces données associées à celles concernant les interneurones reflètent l'extrême complexité de la diversité des neurones corticaux et de leur connectivité qui ne sont encore que partiellement connues.

Tous les processus cellulaires qui viennent d'être décrits sont contrôlés par des programmes génétiques relayés par une régulation de l'expression de protéines notamment de protéines de structures de la cellule. Dans cette deuxième partie nous présentons les composants essentiels du cytosquelette que sont les microtubules ainsi que plusieurs des protéines interagissant avec eux dont certaines sont impliquées dans les pathologies du développement cortical.

## 2. Le réseau de microtubules

Les microtubules (MT) sont l'un des composants du cytosquelette avec les filaments d'actine et les filaments intermédiaires. Ils forment un réseau qui est à la base de nombreuses fonctions cellulaires essentielles tel que le contrôle de la morphologie de la cellule, le trafic intracellulaire dont ils sont la matrice ou encore la division cellulaire. Formant des cylindres polarisés de 25nm, ils sont généralement ancrés à leurs extrémités (-) au centre organisateur des MT (souvent confondu avec le centrosome) et leurs extrémités (+) s'étendent vers le cortex cellulaire. L'extrémité (+) est extrêmement dynamique et en constante balance entre un état de polymérisation, dans lequel le MT s'étend, et un état de catastrophe où il se rétracte (Figure18).

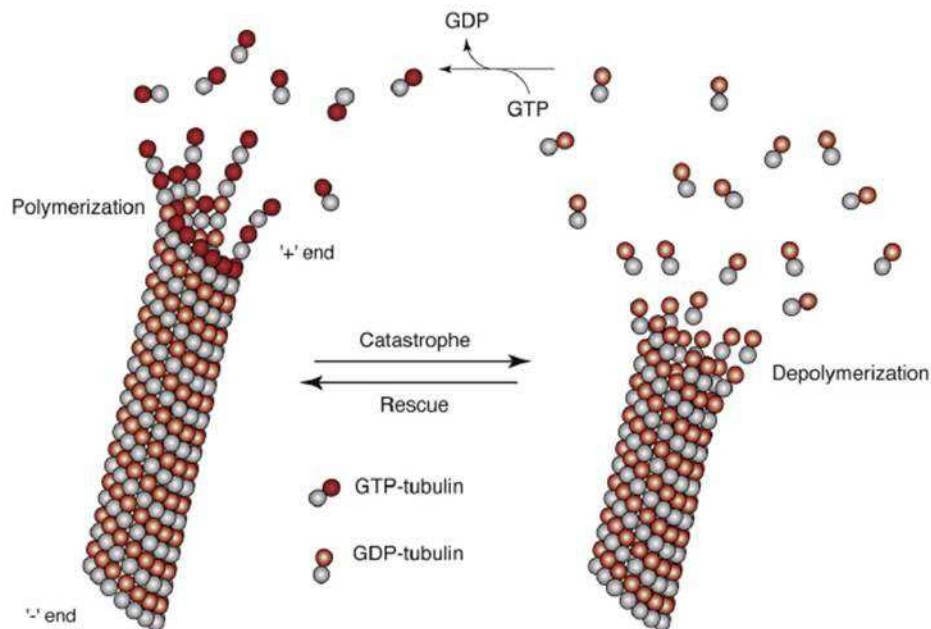


Figure 18 : Les microtubules, une structure dynamique.

Les microtubules oscillent entre un état de polymérisation et de catastrophe. Les hétérodimères de tubulines qui s'incorporent au microtubule en extension sont liés à une molécule de GTP, une fois incorporées ils l'échangent contre une molécule de GDP. (D'après Jaglin et Chelly, 2009)

### 2.1 Les sous unités $\alpha$ - et $\beta$ -tubulines

#### 2.1.1 Gènes des tubulines

Les microtubules sont composés d'hétérodimères de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  qui, assemblés les uns aux autres, forment un tube de 13 proto-filaments. Les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  sont les unités structurales des MT et forment deux familles de gènes très conservées au cours de

l'évolution. Ainsi, la protéine humaine tubuline  $\beta 3$  présente 99% d'homologie avec ses orthologues murin et du xénope.

Il y a de multiples copies des gènes tubulines dans les génomes de la souris et de l'Homme. Ces gènes comprennent 4 exons codants, leur ADN codant est environ de 1500pb et les protéines de 450 acides aminées. La nomenclature de cette famille de gènes a beaucoup évolué ces dernières années avec les avancées du séquençage des génomes. On retrouve actuellement dans les bases de données la présence de 8 gènes de tubulines  $\alpha$  et 8 gènes codant les tubulines  $\beta$  chez la souris. Chez l'homme, les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  sont codées respectivement par 10 (dont un annoté comme pseudogène) et 9 gènes (Tableau1).

#### Homo sapiens

| Alpha         | Référence | Chr |
|---------------|-----------|-----|
| <i>TUBA1A</i> | NM_006009 | 12  |
| <i>TUBA1B</i> | NM_006082 | 12  |
| <i>TUBA1C</i> | NM_032704 | 12  |
| <i>TUBA3C</i> | NM_006001 | 13  |
| <i>TUBA3D</i> | NM_080386 | 2   |
| <i>TUBA3E</i> | NM_207312 | 2   |
| <i>TUBA4A</i> | NM_006000 | 2   |
| <i>TUBA4B</i> | NR_018943 | 2   |
| <i>TUBA8</i>  | NM_018943 | 22  |
| <i>TUBAL3</i> | NM_024803 | 10  |

#### Mus musculus

| Alpha         | Référence    | Chr |
|---------------|--------------|-----|
| <i>Tuba1a</i> | NM_011653    | 15  |
| <i>Tuba1b</i> | NM_011654    | 15  |
| <i>Tuba1c</i> | NM_009448    | 15  |
| <i>Tuba3a</i> | NM_009446    | 6   |
| <i>Tuba3b</i> | NM_009449    | 6   |
| <i>Tuba4a</i> | NM_009447    | 1   |
| <i>Tuba8</i>  | NM_017379    | 6   |
| <i>Tuba13</i> | NM_001033879 | 13  |

#### Béta

| Béta                            | Référence | Chr |
|---------------------------------|-----------|-----|
| <i>TUBB</i><br>( <i>TUBB5</i> ) | NM_178014 | 6   |
| <i>TUBB1</i>                    | NM_030773 | 20  |
| <i>TUBB2A</i>                   | NM_001069 | 6   |
| <i>TUBB2B</i>                   | NM_178012 | 6   |
| <i>TUBB3</i>                    | NM_006086 | 16  |
| <i>TUBB4A</i>                   | NM_006087 | 19  |
| <i>TUBB4B</i>                   | NM_006088 | 9   |
| <i>TUBB6</i>                    | NM_032525 | 18  |
| <i>TUBB8</i>                    | NM_177987 | 10  |
| <i>TUBAL3</i>                   | NM_024803 | 10  |

#### Béta

| Béta          | Référence    | Chr |
|---------------|--------------|-----|
| <i>Tubb1</i>  | NM_001080971 | 2   |
| <i>Tubb2a</i> | NM_009450    | 13  |
| <i>Tubb2b</i> | NM_023716    | 13  |
| <i>Tubb3</i>  | NM_023279    | 8   |
| <i>Tubb4a</i> | NM_009451    | 17  |
| <i>Tubb4b</i> | NM_146116    | 2   |
| <i>Tubb5</i>  | NM_011655    | 17  |
| <i>Tubb6</i>  | NM_026473    | 18  |

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des gènes codant les sous-unités tubulines chez l'homme et la souris.



Ces différentes sous-unités sont également très homologues entre elles au sein d'une même espèce, les divergences étant concentrées principalement dans le domaine C-ter de la protéine. Ainsi, chaque sous-unité  $\alpha$  chez l'homme partage au minimum 72% d'identité protéique avec les autres sous-unités  $\alpha$  avec un taux d'homologie supérieur à 99% pour certaines d'entre elles (Khodiyar *et al.*, 2007). Dans la famille des tubulines  $\beta$ , la tubuline  $\beta$  3 (appelée aussi Tuj1 chez la souris) se caractérise par quelques acides aminés supplémentaires à l'extrémité C-terminal qu'on ne retrouve pas dans les autres sous unités.

## 2.1.2 Structures

Les études de structure de la tubuline ont mis en évidence trois grands domaines fonctionnels (Lowe *et al.*, 2001; Nogales *et al.*, 1999; Nogales *et al.*, 1998) (Figure 19):

- Le domaine N-terminale (acides aminés 1 à 205) qui comprend le domaine d'interaction avec le nucléotide GTP/GDP. Pour la tubuline  $\beta$ , qui possède une activité GTPasique, ce site actif est appelé E (pour Echangeable) alors que pour la tubuline  $\alpha$  qui est incapable de transformer le GTP en GDP, ce site est nommé N (pour Non-échangeable)
- Le domaine intermédiaire (206-385) est impliqué dans les liaisons longitudinales entre l'hétérodimère de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  et latérales entre les protofilaments
- Le domaine C-terminale (386-c-ter) est le siège des interactions avec les protéines associées aux microtubules (MAP) et les protéines motrices telles que les Dynéines et les Kinésines. En effet les modélisations en 3 dimensions le place sur la face extérieure des microtubules. L'extrémité de ce domaine est la queue terminale qui ressort de la face externe du MT.

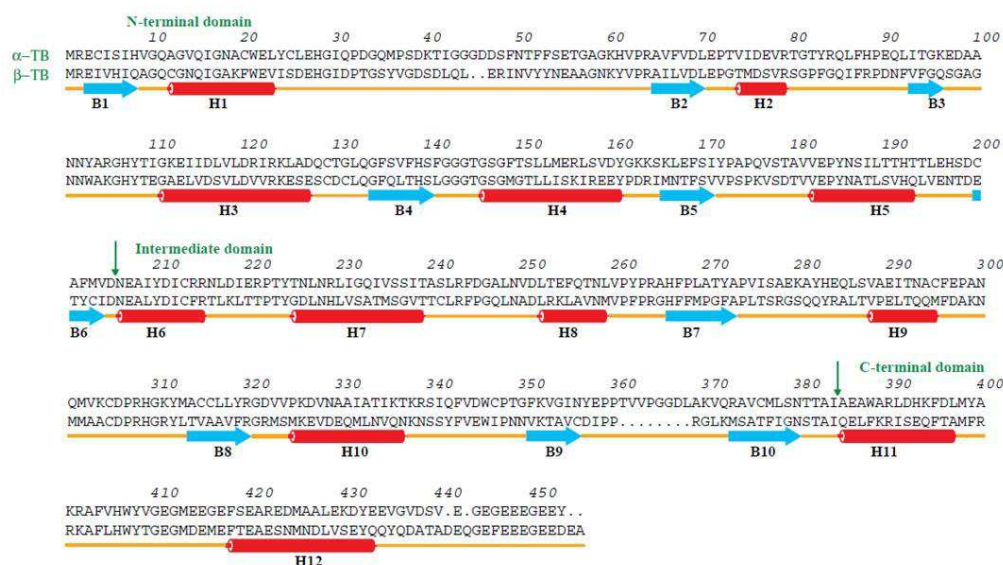


Figure 19 : Structure protéique des tubulines.

Séquences en acide aminé des tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ . Les hélices  $\alpha$  (H1 à H12) sont représentées en rouge et les feuillets  $\beta$  B1 à B10 en bleu. Les boucles sont symbolisées par la ligne jaune. Les limites des trois domaines protéiques sont indiquées par des flèches vertes. (D'après Nogales *et al.*, 1998)

### 2.1.3 Profil d'expression

De part l'homologie des protéines de tubulines décrites précédemment, il n'existe qu'un seul anticorps spécifique d'une sous unité tubuline : la tubuline  $\beta 3$ . Les études de l'expression des sous unité tubulines sont souvent limitées à des études au niveau transcriptionnel. En complément des données disponibles dans les bases de données (<http://genome.ucsc.edu>, <http://www.ensembl.org>), nous avons entrepris au laboratoire une étude d'expression différentielle des sous unités tubulines dans différents extraits de tissus humains : cerveaux fœtal et adulte, cortex, cervelet, fibroblastes, reins et foie (Tableau 2).

|                     | Cerveau fœtal | Cerveau Adulte | Cortex | Cervelet | Fibroblastes | Reins | Foie | Cœur |
|---------------------|---------------|----------------|--------|----------|--------------|-------|------|------|
| <b>Alpha</b>        |               |                |        |          |              |       |      |      |
| <b>TUBA1A</b>       | ++++          | +++            | ++     | +++      | ++++         | ++    | +    | ++   |
| <b>TUBA1B</b>       | ++            | ++             | +      | ++       | ++           | +     | +    | +    |
| <b>TUBA1C</b>       | +++           | +++            | ++     | +++      | +++++        | ++++  | ++++ | +++  |
| <b>TUBA3C</b>       | ++            | +              | +      | +        | +            | +     | +    | +    |
| <b>TUBA3D</b>       | -             | +              | -      | -        | -            | -     | -    | -    |
| <b>TUBA3E</b>       | /             | /              | /      | /        | /            | /     | /    | /    |
| <b>TUBA4A</b>       | /             | /              | /      | /        | /            | /     | /    | /    |
| <b>TUBA4B</b>       | /             | /              | /      | /        | /            | /     | /    | /    |
| <b>TUBA8</b>        | ++            | +++            | ++     | ++       | ++           | +     | +    | ++   |
| <b>TUBAL3</b>       | -             | -              | -      | -        | +            | -     | -    | -    |
| <b>Béta</b>         |               |                |        |          |              |       |      |      |
| <b>TUBB (TUBB5)</b> | ++++          | +++            | ++     | ++       | ++++         | ++++  | ++++ | ++++ |
| <b>TUBB1</b>        | +             | +              | +      | +        | +            | -     | -    | -    |
| <b>TUBB2A</b>       | ++++          | +++            | ++     | ++       | ++++         | +     | +    | +    |
| <b>TUBB2B</b>       | +++           | +++            | +      | ++       | +            | +     | -    | +    |
| <b>TUBB3</b>        | ++++          | +++            | ++     | ++       | +++          | +     | -    | +    |
| <b>TUBB4A</b>       | +++           | +              | +      | +        | -            | -     | -    | -    |
| <b>TUBB4B</b>       | +++           | +++            | ++     | ++       | ++++         | ++    | +++  | +++  |
| <b>TUBB6</b>        | ++            | ++             | ++     | +        | ++++         | ++    | +++  | +++  |
| <b>TUBB8</b>        | /             | /              | /      | /        | /            | /     | /    | /    |

**Tableau 2 : Profils d'expression des sous-unités tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  chez l'homme.**

Les sous-unités ayant été impliquées dans des pathologies du SNC chez l'homme sont surlignées en gras. Les ( / ) signifie que les expériences n'ont pas pu donner de résultats satisfaisants à ce jour. (Données du laboratoire)



Nous avons pu observer des profils d'expression très variés. Certaines sous-unités semblent ubiquitaires comme TUBA1C ou TUBB4B alors que d'autres semblent spécifiques au système nerveux comme TUBB2B ou TUBB4A. On peut aussi constater qu'il y a une grande diversité de tubulines exprimées dans les cerveaux fœtal et adulte comparés au foie ou aux reins dans lesquels peu de différentes sous-unités sont exprimées. Enfin, certaines isoformes de tubulines peuvent être spécifiquement exprimées dans un type cellulaire particulier dans un tissu comme la tubuline  $\beta 3$  exprimée dans les neurones mais pas (ou très faiblement) dans les glies radiaires.

#### 2.1.4 La voie d'hétérodimérisation

La voie de repliement et d'hétérodimérisation des tubulines comprend une série de protéines chaperonnes dont la fonction est de faciliter l'assemblage de l'hétérodimère  $\alpha$ - $\beta$ . Les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  sont d'abord capturées et stabilisées par la préfoldine (PFD), qui agit comme une navette pour transférer les protéines à la chaperonine cytosolique (CCT) avec laquelle elle interagit. CCT permet des repliements des tubulines via un ou plusieurs cycles d'hydrolyse de l'ATP. Les protéines sont alors pris en charge par une série d'autres protéines chaperonnes : TBCB et TBCE, qui prennent en charge la tubuline  $\alpha$  alors que TBCE et TBCD prennent en charge la tubuline  $\beta$  afin de former un super complexe comprenant les tubulines et deux protéines chaperones TBCD et TBCE auxquelles s'ajoute une troisième TBC : la TBCC. La TBCC permet l'hydrolyse du GTP en GDP par la tubuline  $\beta$  qui agit comme un signal de libération de l'hétérodimère de tubuline  $\alpha$ - $\beta$ .

Pour être prêt à être incorporé au protofilament, il faut que la tubuline  $\beta$  échange le GDP pour un GTP. Il sera ensuite de nouveau hydrolysé lors de la polymérisation, ce qui aboutit à un MT ayant une extrémité (+) présentant du GTP et le reste de la longueur du MT lié aux molécules de GDP. (Figure 20, Jaglin, 2009).

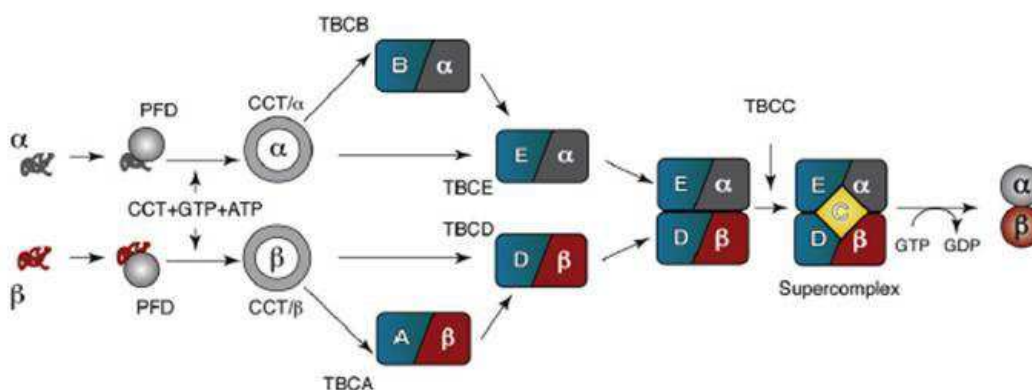
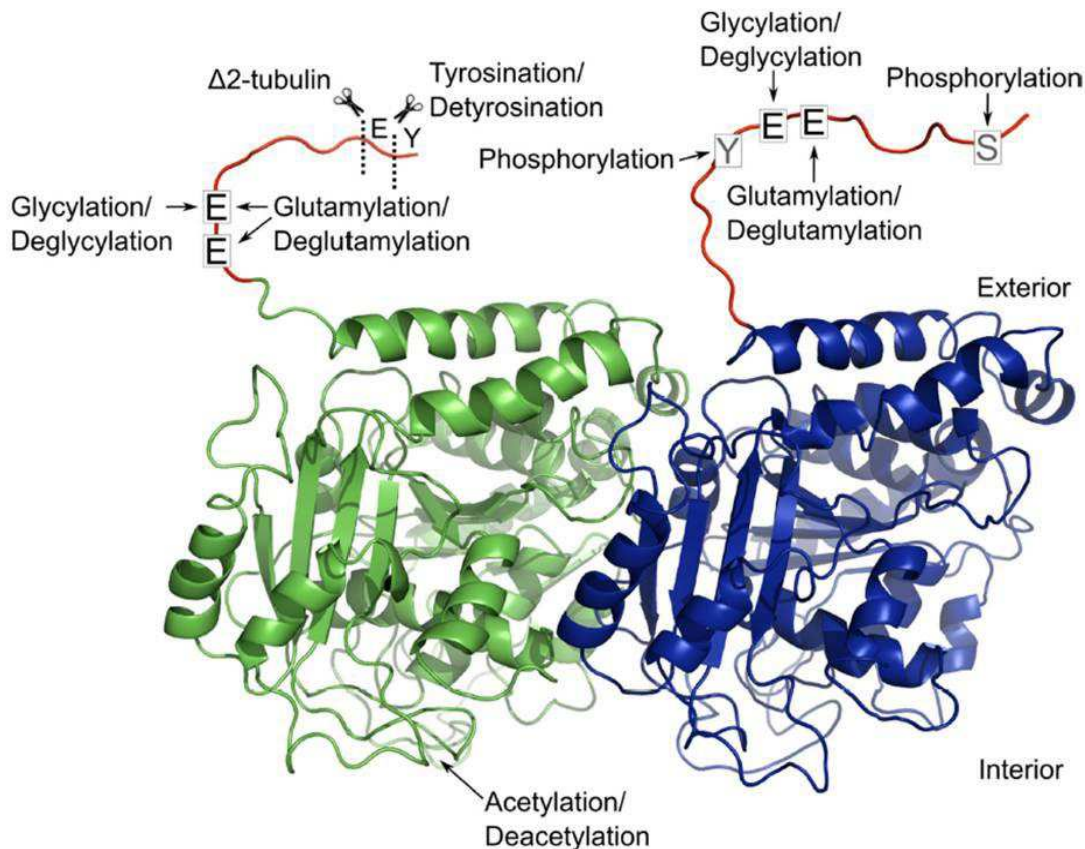


Figure 20 : Voie d'hétérodimérisation des tubulines.

## 2.2 Les modifications post-traductionnelles

Les MT sont aussi caractérisés par d'importantes modifications post-traductionnelles qui permettent de moduler et de diversifier leurs caractéristiques fonctionnelles. Le domaine C-terminal, et particulièrement les derniers acides aminés des tubulines exposés à la surface du MT sont le lieu de la majorité de ces modifications (Figure 21, Garnham).



**Figure 21 : Modifications post-traductionnelles des tubulines**

Ce schéma représente les différentes modifications post-traductionnelles ayant lieu sur les tubulines  $\alpha$  (en vert) et  $\beta$  (en bleu) ; la queue du domaine C-terminale est représentée en rouge. (D'après Garnham *et al.*, 2012)

Toutes ces modifications post-traductionnelles peuvent être combinées pour donner une plus grande diversité protéique à la famille des tubulines. Il est proposé que ces modifications forment un «code tubuline» biochimique qui peut être « lu » par différents facteurs qui interagissent avec les MT tels que les protéines associées aux MT (MAP) ou les protéines motrices Kinésines ou Dynéines (Verhey and Gaertig, 2007).

### 2.2.1 Les cycles de détyrosination-tyrosination.

En 1973, Barra et coll. ont rapporté l'addition d'une tyrosine à une protéine abondante dans un extrait protéique de cerveau qu'ils identifient plus tard comme étant une tubuline (Barra *et al.*, 1974; Barra *et al.*, 1973). Des études suivantes montrent que la plupart des tubulines  $\alpha$  ont comme dernier acide aminé une tyrosine qui peut être soumise à des cycles de détyrosination et de re-tyrosination (Russell *et al.*, 1984; Sherwin *et al.*, 1987). Le produit de la détyrosination est appelé Glu-tub car le dernier acide aminé est alors un acide glutamique. Cette forme de tubuline  $\alpha$  est enrichie dans les MT stables de longue durée ayant une demie-vie de 16 heures environ. Les tubulines tyrosinées (ou Tyr-Tub) sont retrouvées principalement dans les microtubules dynamiques ayant une demie vie d'environ de 3 à 5 minutes (Webster *et al.*, 1987). La différence de stabilité des Glu-Tub et Tyr –Tub n'est pas due directement au changement d'acide aminé par lui-même, mais aux modifications de liaison avec les protéines de régulation de la dynamique des MT qu'elle entraîne (Peris *et al.*, 2006; Peris *et al.*, 2009). La tyrosination se produit principalement sur les tubulines  $\alpha$  solubles (Szyk *et al.*, 2011).

Le produit de la détyrosination (Glu-Tub) peut lui aussi être modifié par l'enlèvement de l'acide glutamique terminal formant une  $\Delta 2$ -Tubuline. Cette forme de  $\Delta 2$ -tubuline est très abondante dans les neurones. Elle ne peut pas être reconvertie en Glu-tub ou en Tyr-Tub et est donc ainsi retirée du cycle de tyrosination-détyrosination (Paturle-Lafanechere *et al.*, 1991).

Différentes études ont montré que la présence ou l'absence de la tyrosine peut jouer le rôle d'interrupteur « ON -OFF » pour le recrutement de régulateurs de la dynamique des MT. Par exemple, la protéine MCAK (mitotic centromere associated kinesin) dépolymérise préférentiellement les Tyr-MT contribuant par là même à la vie courte de ces MT (Peris *et al.*, 2009). De plus, la tyrosination est nécessaire au recrutement de protéines se liant spécifiquement aux extrémités (+) des MT tels que Cytoplasmic Linker protein170 (CLIP170) ou p150Glued (Gupta *et al.*, 2010). Enfin, dans les neurones, la tyrosination agit comme un signal négatif sur la Kinésine 5 et ainsi, l'empêche de rentrer dans les dendrites riches en Tyr-Tub (Konishi and Setou, 2009).

### 2.2.2 L'acétylation

L'acétylation a lieu uniquement sur les tubulines  $\alpha$  et est un phénomène réversible (L'Hernault and Rosenbaum, 1983, 1985a, 1985b). Les MT acétylés sont associés aux MT à vie longue notamment dans l'axonème des cils et dans les axones (Gaertig *et al.*, 1995; Hammond *et al.*, 2010). Des études ont prouvé que l'acétylation est une conséquence et donc un marqueur de la stabilité des MT et non l'inverse (Webster and Borisy, 1989).

Contrairement aux autres modifications post-traductionnelles, l'acétylation a lieu dans le domaine N-terminal sur la lysine en position 40 dans une boucle prédite pour être dans la lumière du MT (Nogales *et al.*, 1998). Toutefois il n'est pas impossible que lors de l'assemblage des hétérodimères la boucle soit réarrangée et présente la Lysine 40 à l'extérieur du MT. En effet le positionnement dans la lumière est remis en doute par des études montrant que l'acétylation avait un effet sur la vitesse du transport protéique intracellulaire sur la surface des MT ainsi que sur la liaison de la Kinésine1 à ceux-ci (Reed *et al.*, 2006).

### 2.2.3 Polyglutamylation et polyglycylation

La polyglutamylation et la polyglycylation sont des modifications post-traductionnelles très répandues qui conduisent à l'addition d'une chaîne de tailles variables d'acides glutamiques ou de glycines à la queue c-terminale des tubulines  $\alpha$  ou  $\beta$ . Elles se produisent sur les tubulines déjà intégrées au MT au niveau de glycines ou d'acides glutamiques de la queue c-terminale (Regnard *et al.*, 1998). La polyglutamylation est fréquente dans les MT neuronaux ainsi que dans les MT stables (Audebert *et al.*, 1993). La distribution des MT polyglycylés est plus restreinte, on les retrouve principalement dans MT stables des cilles et des flagelles (Redeker *et al.*, 1994).

Les sites de polyglutamylation se situent près des sites de liaisons des protéines motrices et des MAP, il est donc cohérent qu'il ait été montré que la suppression de la polyglutamylation entraîne une diminution de la motilité des moteurs moléculaires Kinésines et Dynéines (Wang and Sheetz, 2000). De plus, la longueur de la chaîne polyglutamylée a un impact sur la liaison avec les MAP. Ainsi MAP1B, MAP2 et Tau ont une affinité plus grande avec les chaînes de 1 à 3 acides glutamiques alors que MAP1A préfère les MT présentant de plus longues chaînes d'acides glutamiques (Bonnet *et al.*, 2001).

## 2.3 L'hypothèse multi-tubuline

L'hypothèse « multi-tubuline » propose que derrière l'apparente identité des différentes sous-unités tubulines peut se cacher des spécificités cellulaires et fonctionnelles particulières aux différentes isoformes (Cleveland, 1987). Ainsi, bien que toutes les isoformes de tubulines puissent remplir les mêmes fonctions basiques, telle que s'hétérodimériser avec n'importe quelle autre sous-unité ou s'incorporer au réseau de MT en interphase (Lewis and Cowan, 1988), différentes études tendent à confirmer la spécificité fonctionnelle des sous-unités que laisse déjà apercevoir leurs différents patrons d'expression.

La non-interchangeabilité des sous-unités tubuline a été montrée chez la drosophile qui ne comprend que trois sous-unités  $\beta$ . L'inactivation de la tubuline  $\beta 2$  dans la lignée germinale male qui n'exprime que cette sous-unité, entraîne des défauts de l'axonème et du fuseau

mitotique. Seule la ré-expression de la sous unité  $\beta 2$  peut corriger ces défauts, la surexpression de la sous unité  $\beta 3$  échouant à sauver le phénotype (Hoyle and Raff, 1990).

Récemment des expériences d'extinctions distinctes de différentes sous-unités de tubulines  $\beta$  ont été entreprises dans une lignée différenciée de neuroblastome humain et ont montré l'apparition de trois phénotypes cellulaires différents. La sous expression de la tubuline  $\beta 1$  entraîne une forte augmentation de la mort cellulaire, la  $\beta 3$  une diminution de 40% de la longueur des neurites et la  $\beta 2$  a pour conséquence une disparition presque totale de ceux-ci (Guo *et al.*, 2010). Ces données suggérant que des rôles fonctionnels uniques de chaque sous-unité sont nécessaires à un développement neuronal convenable, sont en faveur de l'hypothèse multi-tubuline.

D'un autre côté, Niwa et coll. ont exploré les effets négatifs sur le transport axonal de la surexpression de mutants du gène *TUBB3* responsable d'un syndrome oculomoteur associé à une neuropathie chez l'homme (voir troisième partie de l'introduction). Ils ont pu montrer que l'effet délétère de ces mutations n'est pas spécifique de la sous-unité tubuline mais de l'acide aminé qui est muté.

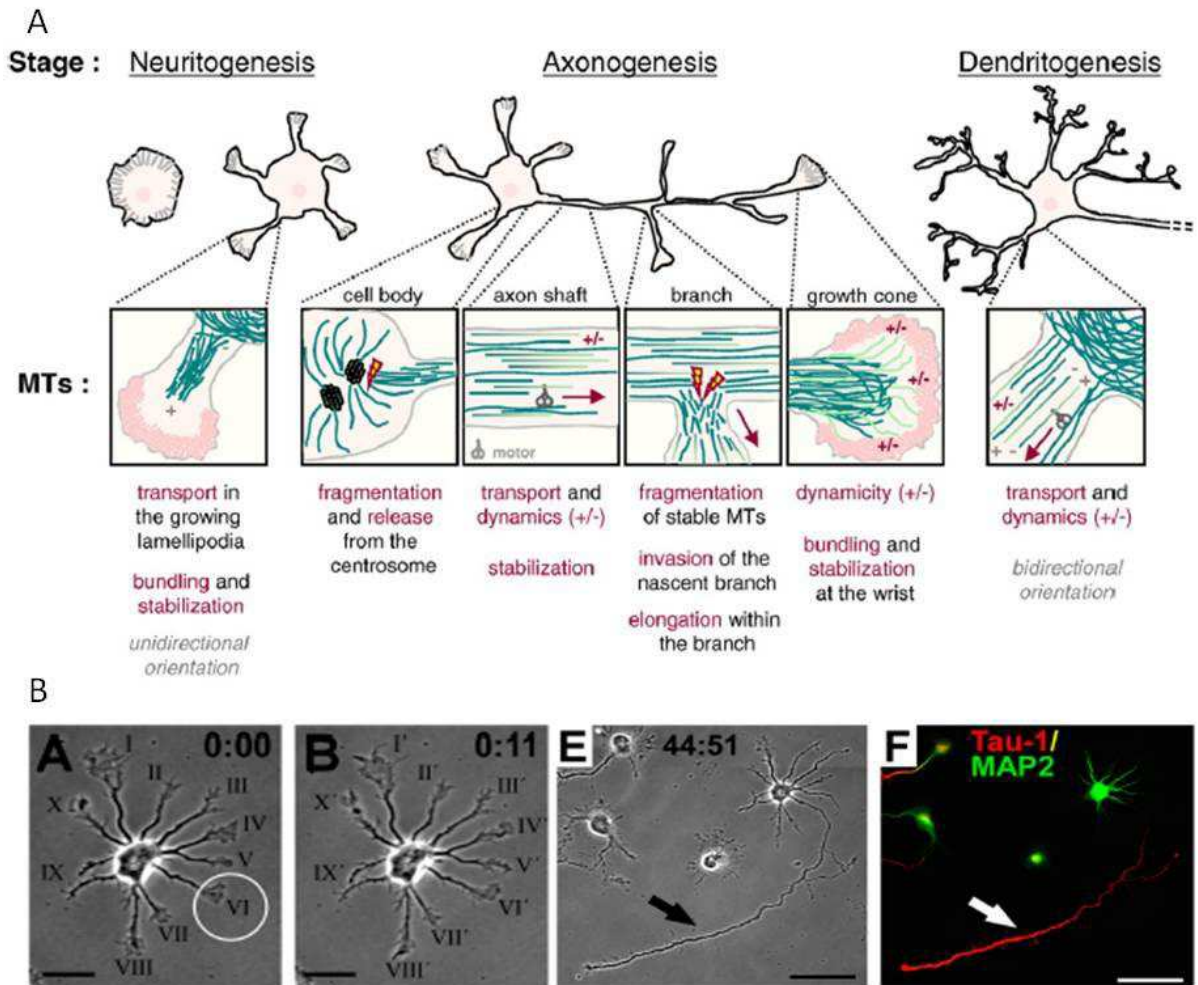
Ce concept de spécificité des sous-unités tubuline est donc toujours débattu et de nouvelles études *in vivo* sont nécessaires pour tester cette hypothèse dans les processus du développement cortical.

## 2.4 Microtubules et morphogenèse neuronale *in vitro*.

La morphogenèse neuronale se déroule par des étapes successives, la formation de l'axone précédant généralement celle des dendrites. Le modèle le plus utilisé pour caractériser ces phénomènes sont les neurones hippocampaux d'embryons de rat.

Après attachement à la surface, le neurone développe de nombreux lamellipodes, puis plusieurs processus courts morphologiquement identiques appelés neurites. L'un d'entre eux s'étend alors plus rapidement et se développe en un axone alors que les autres interrompent leur croissance. Le neurone casse alors sa symétrie et devient polarisé. Les neurites restants vont reprendre leur extension quelques jours plus tard et deviennent des dendrites branchés.

La neuritogenèse, l'axonogenèse et la dendritogenèse, qui sont des événements cruciaux pour l'acquisition de la polarité neuronale, reposent de façon importante sur l'organisation et la dynamique des MT et du réseau d'actine (Figure 22-A)



**Figure 22 : Réorganisation des microtubules lors de la morphogénèse *in vitro*.**

**(A)** Réorganisation du réseau de microtubules lors des étapes de neuritogénèse, axonogénèse et dendritogénèse d'un neurone en différenciation en culture *in vitro*. (D'après Poulain et Sobel, 2010). **(B)** La stabilisation locale des microtubules promeut la formation axonale. (B-A) neurone hippocampal de rat en culture, (B-B) 11 minutes après photo-activation du taxol en cage à la pointe du processus VI choisi de façon aléatoire. (E,-F) Deux jours après activation, le processus VI est devenu l'axone (flèche) qui exprime la protéine Tau-1 (rouge) mais pas MAP2 (verte). (D'après Witte *et al.*, 2008)

### 2.4.1 Etape de l'acquisition de la polarité neuronale *in vitro*

#### a- La neuritogénèse

Durant l'apparition des lamélipodes, des MT vont les coloniser et former des «bundles», c'est-à-dire des paquets de filaments de MT assemblés très stables. La stabilisation et la polymérisation des MT acétylés vers la surface apicale du lamélipode permettent l'élongation du lamélipode et sa transformation en neurite.

La stabilisation des MT est essentielle pour le choix du neurite qui deviendra l'axone. En effet, en plus de la présence très enrichie en MT stables dans les axones en comparaison des dendrites, une étude a montré que la stabilisation locale des MT grâce à la photo-activation

de taxole de façon spécifique dans un neurite du choix de l'expérimentateur suffit à transformer ce neurite en futur axone (Witte *et al.*, 2008) (Figure 22-B). Cette stabilisation asymétrique des MT dans les neurites peut être déclenchée par des signaux extracellulaires ou par des composants intracellulaires tels que le positionnement du centrosome en face du futur axone (de Anda *et al.*, 2005).

### **b- L'axonogenèse**

L'élongation de l'axone est fortement dépendante, en plus de l'incorporation de nouvelles structures membranaire, de l'addition de nouveaux polymères de MT (Daniels, 1975). L'élongation des MT à l'extrémité des axones se fait de deux façons : par l'incorporation d'hétérodimères de tubuline  $\alpha$ - $\beta$  directement à l'extrémité (+) (Bamburg *et al.*, 1986), ou par le transport le long des MT de fragments de microtubules pré-assemblés du corps cellulaire vers l'extrémité (+) de l'axone en croissance (Lasek, 1986) (Figure 22-A).

Les MT ont une organisation particulière dans le cône de croissance. Ils forment une structure parallèle et dense dans l'axone mais tendent à se séparer dans le cône de croissance. Ils adoptent une morphologie droite dans les cônes de croissance en extension et en forme de boucle dans ceux qui sont en pause (Gordon-Weeks, 2004). Les Tyr-Tub sont enrichies dans le cône de croissance où ils se lient aux structures d'actines et régulent leurs formations et leur dynamique.

La polymérisation et la dépolymérisation des MT à l'extrémité de l'axone semblent essentielles pour réguler le taux de croissance axonale (Yu *et al.*, 1996). Ils semblent également cruciaux pour la guidance axonale puisque que le blocage de la dynamique des MT empêche la redirection du cône de croissance en réponse à un signal de guidage (Buck and Zheng, 2002).

Des branchements se forment sur les axones. Les observations au niveau de ces points de branchements ont montré une augmentation du nombre de MT à ces endroits et leur fractionnement en MT courts. Les fragments de MT envahissent le branchement en formation et y effectuent des mouvements dans les deux sens (Dent *et al.*, 1999) (Figure 22-A). Les MT sont acétylés dans les régions proximales du branchement et tyrosinés en dystal, indiquant que la polymérisation des MT a lieu à l'extrémité distale du branchement (Dent and Kalil, 2001).

### **c- La dendritogenèse**

A la suite de l'axonogenèse, les autres neurites s'allongent pour former l'arbre dendritique. Ce phénomène est accompagné d'une complète réorganisation du réseau de MT. Alors que les neurites non différenciés montrent des MT dont les extrémités (+) sont uniformément



dirigées vers la partie distale, une seconde population de MT orientée à l'opposé apparaît dans les dendrites en formation. Par la suite les dendrites possèdent une proportion équivalente de MT avec des extrémités (+) dirigés vers le cône de croissance qu'en direction du corps cellulaire (Baas *et al.*, 1988) (Figure 22-A). Lors de l'élongation des dendrites, des portions de microtubules préformés sont convoyés à l'extrémité des dendrites pour être assemblées aux MT principaux.

La bidirectionnalité des MT est essentielle à la formation des dendrites. En effet si on empêche la réorientation des MT dans des neurones *in vitro*, les dendrites deviennent incapables de se former correctement et certains d'entre eux acquièrent des caractéristiques morphologiques axonales (Sharp *et al.*, 1997). Toutefois, cette bipolarité semble réversible dans certains dendrites *in vivo*. Une étude a montré que les MT présentent une bipolarité aux étapes précoces du développement mais deviennent principalement unidirectionnels dans les dendrites des neurones pyramidaux et hippocampaux des cerveaux matures (Kwan *et al.*, 2008).

Enfin, alors que l'on pensait les épines dendritiques exemptes de MT, des études confocales récentes ont montré que les MT y étaient présents, qu'ils y étaient très dynamiques et qu'ils sont nécessaires à leur formation (Gu *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008; Jaworski *et al.*, 2009).

#### 2.4.2 Dynamique des microtubules et morphogenèse neuronale

Les phases de réorganisation du réseau de MT, nécessaires lors des différentes phases de morphogenèse neuronale, sont basées sur un contrôle fin de leur homéostasie. Ce contrôle est médié à la fois par la promotion de la polymérisation ou de la dépolymérisation de l'extrémité (+) des MT et aussi par la stabilisation du MT lui-même (Figure 23, Conde, 2009).

##### **a- Contrôle de la balance polymérisation-dépolymérisation**

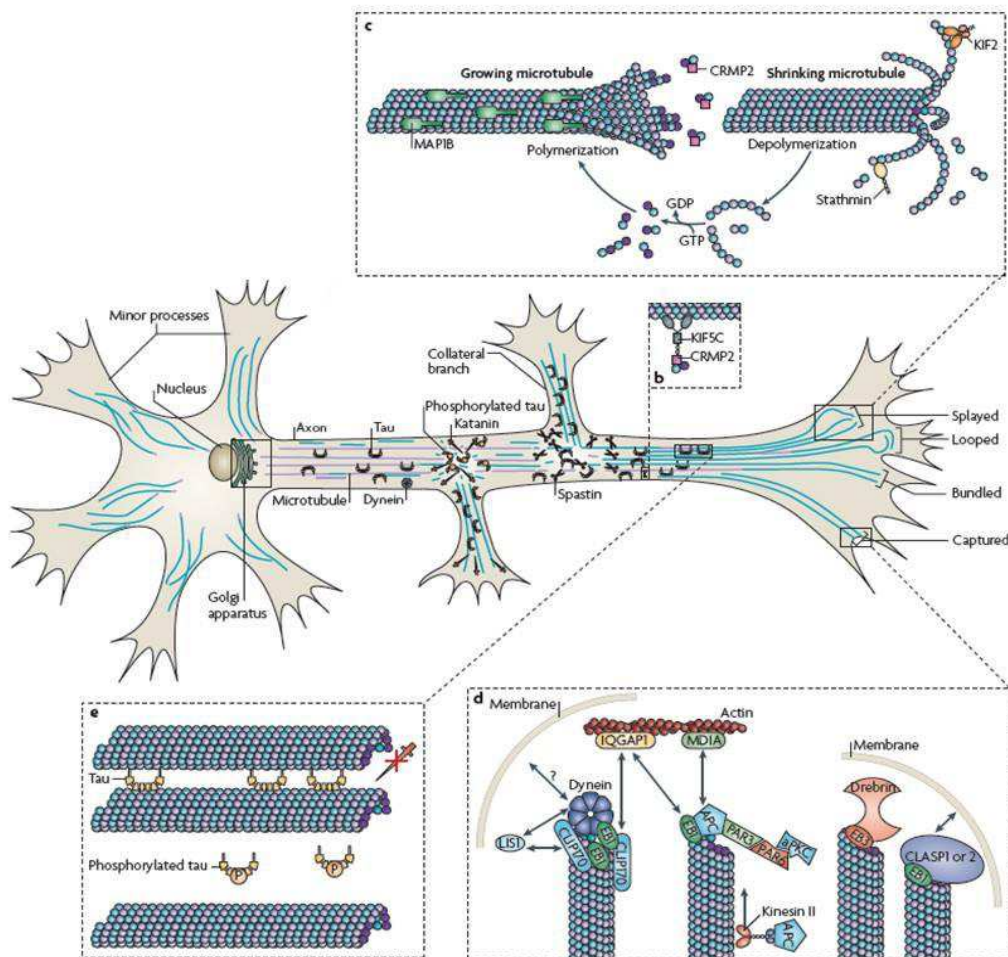
###### **(i) La polymérisation**

La famille des Collapsin Response Mediator Proteins (CRMP) est la principale famille protéique identifiée comme facteurs de polymérisation des MT dans les neurones en développement. Les 5 membres de cette famille présentent deux variants d'épissage A et B. Ils interagissent tous directement avec les hétérodimères de tubulines  $\alpha$ - $\beta$  libres ainsi qu'avec les MT avec une plus faible affinité. Ils sont tous exprimés presque exclusivement dans le système nerveux avec des patrons d'expression spatio-temporels différents. Ainsi, CRMP-2A est spécifiquement exprimé dans les axones après polarisation alors que CRMP-2B est ubiquitaire dans le neurone (Yuasa-Kawada *et al.*, 2003). Les études sur CRMP-2 ont montré



qu'il promeut l'assemblage des MT et augmente leur taux de croissance à leur extrémité (+) (Fukata *et al.*, 2002)(Figure 24). Son interaction avec la Kinésine-1 et son accumulation à l'extrémité (+) des MT suggèrent que CRMP-2 transporte les hétérodimères aux extrémités (+) et les incorpore directement aux extrémités en polymérisation des MT. CRMP-4A, quand à elle, favorise la pousse et le branchement neuritique alors que CRMP-1B diminue la longueur axonale (Deo *et al.*, 2004; Quinn *et al.*, 2003). Enfin, la surexpression de CRMP-5B induit la formation de cônes de croissance surnuméraires, ce qui semble ralentir l'élongation neuritique (Hotta *et al.*, 2005).

En outre des CRMP, d'autres facteurs de polymérisation ont été mis à jour. De façon identique aux CRMP la guanin deaminase cytin se lie aux tubulines et promeut l'assemblage des microtubules (Chen and Firestein, 2007). Enfin, la protéine RGS2, régulateur de la signalisation des protéines G, est un promoteur de la polymérisation des microtubules et accroît la pousse neuritique (Heo *et al.*, 2006).



**Figure 23 : Organisation et régulation des microtubules dans l'axone en développement.**

Les microtubules (MT) dynamiques sont représentés en bleu et les stables en mauve. (b) transport des hétérodimères de tubuline vers le cône de croissance par KIF5C et CRMP2. (c) Des protéines comme CRMP2 promeuvent l'assemblage des MT alors que MAP1B contribue au maintien de la dynamique des MT et KIF2 induit la dépolymérisation des MT. (d) montre la machinerie protéique permettant l'ancrage des MT à la membrane et (e) illustre l'action protectrice de Tau contre la déstabilisation des MT et l'émergence de branchements axonaux excessifs. (D'après Conde *et al.*, 2009)

## (ii) La dépolymérisation

La dépolymérisation des MT (ou catastrophe) est un mécanisme important qui contrecarre et complète la polymérisation pour la régulation de la dynamique des MT. Elle est nécessaire notamment pour la rétractation des neurites ou la réorganisation des branches.

Dans les neurones, des kinésines particulières ont été mises en évidence comme des facteurs majeurs de la dépolymérisation. Les membres de la super famille des kinésines sont principalement des protéines motrices qui transportent des macromolécules ou des organelles le long des MT. Parmi eux, KIF24 et les KIF2A, -B et -C, sont retrouvées enrichies aux extrémités (+) et (-) des MT où ils déclenchent leur désassemblage. Les protéines KIF2 sont transitoirement exprimées dans les neurones en développement et s'accumulent dans les cônes de croissance (Noda *et al.*, 1995). L'analyse du KO murin révèle un rôle important de KIF2A dans la régulation des branchements axonaux. Dans les neurones invalidés pour KIF2A les MT s'allongent trop loin et poussent ainsi en avant le cône de croissance promouvant donc son extension. De plus, ils présentent une sur-élongation trop importante des branchements axonaux. KIF2A semble donc réguler la dynamique des MT au cône de croissance par dépolymérisation et supprime ainsi l'extension des branches axonales collatérales (Homma *et al.*, 2003).

### **b- Contrôle de la stabilité des MT**

Le contrôle de la stabilité des MT est un processus majeur pour les changements morphologiques que subissent les neurones, notamment dans l'établissement et le maintien de la bipolarité. Plusieurs familles de protéines stabilisatrices sont exprimées dans les neurones, la liste ci-dessous n'est pas exhaustive et décrit quelques unes de ces protéines parmi lesquelles les MAPs classiques, les protéines STOPs, Doublecortine et celles des extrémités (+) sont les mieux caractérisées.

## (i) Les MAPs classiques

Les Microtubule Associated Protein (MAP) sont des protéines associées aux MT appelées aussi « MAP structurelles » qui se lient au réseau de MT et régulent sa polymérisation et sa stabilité. Elles peuvent être divisées en 3 familles : MAP1, MAP2 et Tau.

## - MAP1

Cette famille est composée elle-même de trois membres : MAP1A, MAP1B et MAP1S. Les protéines MAP1 régulent la stabilisation des MT et leur fasciculation en se liant à eux et en formant des ponts entre eux (Halpain and Dehmelt, 2006).

MAP1B est exprimée très tôt dans le développement et est la première MAP structurelle à être exprimée par les neurones. Elle est présente dans tous les compartiments neuronaux mais est enrichie dans les axones en croissance et dans leur cônes de croissance où elle régule la pousse axonale (Bush *et al.*, 1996). Le mode de fonctionnement de MAP1B sur la dynamique des MT fait encore débat. Toutefois, on observe que des neurones hippocampaux déplétés de MAP1B présentent un retard de formation de l'axone associé à une baisse importante des Tyr-MT et une augmentation des Glu-MT suggérant que MAP1B préservent les polymères de MT dynamiques dans les axones en croissance (Gonzalez-Billault *et al.*, 2001). A l'inverse, dans les neurones adultes de ganglions rachidiens la déficience en MAP1B, entraîne une augmentation du branchement des axones avec une augmentation des MT acétylés et pas de variation des Tyr-MT (Bouquet *et al.*, 2004). Ces discordances peuvent être expliquées par une compensation par MAP2 ou Tau car on observe une augmentation de la liaison aux MT de ces protéines en réponse à l'inhibition de MAP1B (Gonzalez-Billault *et al.*, 2001).

## - MAP2

La famille MAP2 se compose de deux groupes d'isoformes alternatives d'un même gène : MAP2A et MAP2B spécifiquement exprimés dans le soma et les dendrites des neurones d'un côté, et de l'autre MAP2C et MAP2D présents de façon ubiquitaire dans les neurones et les glies. Ils ont aussi un patron d'expression temporel différent : MAP2C est exprimé dans les premières étapes du développement, alors que MAP2B est présent aux stades développemental et adulte. MAP2A s'exprime quand MAP2C commence à diminuer (Binder *et al.*, 1984; Chung *et al.*, 1996; Garner *et al.*, 1988). Les capacités de MAP2 à stabiliser les MT, à augmenter leur rigidité et à promouvoir leur nucléation, lui confèrent des fonctions essentielles dans la morphogenèse neuronale. L'inhibition de MAP2 dans les neurones d'hippocampe et de cervelet empêche la croissance neuritique et axonale, si cette inhibition a lieu après la formation des neurites, elle déstabilise les MT et réduit le nombre de neurites (Caceres *et al.*, 1992; Gonzalez-Billault *et al.*, 2002). A l'inverse la sur-expression de MAP2 augmente les branchements axonaux (Fukata *et al.*, 2002). Tous ces résultats montrent l'importance de MAP2 dans de nombreux phénomènes de morphogenèse.

Tout comme MAP2, les six isoformes de la protéine Tau identifiées dans les neurones se lient aux MT, les stabilisent, encouragent leur assemblage et permettent leur nucléation. L'inhibition de Tau avant ou après le début de la polarisation neuronale empêche la formation de l'axone ou induit sa perte respectivement, indiquant un rôle crucial à la fois dans la formation et le maintien de l'axone (Caceres and Kosik, 1990; Caceres *et al.*, 1991; DiTella *et al.*, 1996). Plus récemment Tau a aussi été mis en évidence dans la formation des branchements axonaux (Yu *et al.*, 2008)(Figure 24).

Les protéines Tau et MAP1B semblent avoir une redondance fonctionnelle et pouvoir compenser l'inactivation de l'un ou de l'autre car que le double KO montre des défauts plus sévères que les modèles murin d'inactivation simple (Takei *et al.*, 2000).

## (ii) Les protéines STOP

Les protéines STOP (Stable-Tubule-Only-Peptide) ont été identifiées comme le facteur impliqué dans la stabilité de certains MT au froid, propriété qui n'est pas conférée par les MAPs classiques (Bosc *et al.*, 1996; Job *et al.*, 1982). Les différentes isoformes d'épissage N-STOP (Neuronal adult STOP), E-STOP (Early STOP) et F-STOP (Fibroblastic STOP) ont des structures différentes leur donnant des propriétés distinctes de liaison et de stabilisation des MT. Alors que N-STOP et E-STOP s'associent aux MT à température physiologique, F-STOP reste soluble et ne se lie aux MT qu'à des températures froides. N-STOP et E-STOP sont fortement exprimés dans le système nerveux, E-STOP étant l'isoforme spécifique des neurones et très exprimé pendant l'embryogenèse. Les protéines STOP semblent se lier préférentiellement aux MT stables et leur inhibition dans des cellules PC12 inhibe la formation des neurites, suggérant un rôle dans la différenciation neuronale (Guillaud *et al.*, 1998). Tout comme Tau et MAP2, le modèle murin d'inactivation de STOP ne présente pas de phénotype développemental majeur mais un défaut de plasticité synaptique (Andrieux *et al.*, 2002).

## (iii) Doublecortine

Contrairement aux autres protéines stabilisatrices des MT, Doublecortine (DCX) se lient aux MT à la jonction de 4 monomères de tubuline, ce qui permet une stabilisation à la fois des interactions latérales et longitudinales (Moore *et al.*, 2004). DCX favorise la formation de « bundles » de MT, leur nucléation et les stabilise en empêchant leur dépolymérisation. DCX est très fortement exprimé dans le cerveau en développement et a un rôle majeur dans l'acquisition de la polarité neuronale puisque des neurones en culture sur-exprimant DCX présentent une augmentation du nombre de neurites avec un axone élargi et fortement

branché (Bielas *et al.*, 2007). A l'inverse, l'inhibition de DCX entraîne une diminution du développement, du branchement des dendrites (Cohen *et al.*, 2008) ainsi que de la longueur des axones (Deuel *et al.*, 2006). Ce dernier phénotype est accentué si l'inhibition de Dcx a lieu dans des neurones KO pour la kinase Dclk (Doublecortin like kinase) qui partage avec Dcx les domaines « DCX » de liaisons aux MT (Deuel *et al.*, 2006), montrant ainsi la synergie de ces deux protéines dans la différenciation neuronale.

#### (iv) Les protéines des extrémités (+)

A l'inverse des MAP classiques, des protéines STOP et de Doublecortine, qui se lient le long des MT, les protéines des extrémités (+) (+TIP) s'accumulent aux extrémités (+) des MT en extension où elles contrôlent leur dynamique et leur association avec les organelles et l'actine. Certains des membres de cette famille peuvent aussi être impliqués dans le contrôle de la morphogenèse neuronale.

La protéine Cytoplasmic Linker Proteins 170 (CLIP-170) interagit avec les tubulines et permet leur oligomérisation aux extrémités de MT en croissance. Elle a besoin de l'autre protéine +TIP EB1 pour se lier spécifiquement aux extrémités (+) tyrosinées (Dixit *et al.*, 2009). CLIP170 agit comme un facteur de sauvetage en convertissant les MT en dépolymérisation en MT polymérisant (Komarova *et al.*, 2002).

Les protéines CLASP (Clip Associated Proteines), caractérisées dans un premier temps par leur liaison aux protéines CLIP, sont fortement exprimées dans le cerveau. Elles stabilisent les MT à la périphérie cellulaire en se liant également à EB1 et en promouvant des périodes de pauses, restreignant leur polymérisation (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2005). Dans les neurones elles s'accumulent dans le cône de croissance et sont détectées le long des MT s'étendant vers celui-ci. Les protéines CLASP sont des facteurs « clés » de la guidance axonale et de la motilité du cône de croissance (Lee *et al.*, 2004).

APC (Adenomatous Polyposis Coli) est une protéine très connue pour son rôle d'antagoniste dans la voie de signalisation Wnt. Elle stabilise les MT et semble promouvoir leur polymérisation *in vitro* et *in vivo* (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2000). Dans les neurones, on la retrouve enrichie dans les extrémités des axones en croissance (Figure 24). Sa déplétion entraîne la formation de MT en boucle et un ralentissement de la pousse axonale (Purro *et al.*, 2008). APC apparaît donc comme un facteur important de l'initiation de l'axone et de son élongation. Il semble aussi avoir un rôle dans l'orientation du cône de croissance.

Premièrement identifiée comme un partenaire de APC, la protéine EB1 est rapidement apparue comme essentielle aux complexes protéiques des extrémités (+) de part ses interactions avec presque toutes les autres protéines +TIP.

La famille des protéines End Binding comprend trois membres : EB1 et EB2 exprimées ubiquitairement et EB3 exprimée de façon préférentielle dans le système nerveux (Nakagawa *et al.*, 2000). EB1 se fixe préférentiellement aux protofilaments des extrémités

(+) qui ne se sont pas encore refermés et les aident à se lier les uns aux autres pour former le tube du MT (Sandblad *et al.*, 2006). EB3, quant à elle, semble essentiel à la neuritogenèse en permettant aux MT de se lier à l'actine (Geraldo *et al.*, 2008).

Les protéines stabilisatrices des MT sont donc essentielles à la croissance et à la maintenance des structures du cytosquelette durant la morphogenèse neuronale. Elles partagent des caractéristiques communes telle que la protection contre la dépolymérisation, mais montrent aussi des différences dans leurs patrons d'expression spatiotemporelle durant le développement ou dans leur affinité de liaisons aux MT. Ces particularités leur conférant des rôles spécifiques à chaque étape de la différenciation neuronale.

### **c- Modulation de l'activité des MAP par phosphorylation**

L'activité des protéines régulant l'homéostasie des MT dans la morphogénèse neuronale est contrôlée par différentes modifications post-traductionnelles et des voies de signalisation cellulaire mettant en jeu notamment les Rho GTPases et des Kinases répondant à des stimuli extracellulaires. On peut noter notamment l'importance de la phosphorylation des MAP pour le contrôle de leur activité. Ainsi, la phosphorylation de Dcx par la sérine/thréonine kinase Cdk5 (Cyclin Dependent Kinase 5) entraîne une diminution de son affinité de liaison avec les MT et l'en détache dans les neurones en culture (Tanaka *et al.*, 2004).

De même, la Kinase GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3  $\beta$ ) a pour substrat les protéines APC, CRMP-2, Tau ou MAP1B. L'inhibition de cette kinase par AKT entraîne la réduction de la phosphorylation des MAP et permet leur liaison aux MT et leur activité stabilisatrice (Gonzalez-Billault *et al.*, 2004; Inagaki *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2004; Sperber *et al.*, 1995).

Les familles des protéines SAD/BRSK (BR Serine/Threonin Kinase) et MARK (MAP/microtubule Affinity-Regulating Kinase) régulent la stabilité des MT via leur action sur les MAP : elles phosphorylent les domaines de liaison aux MT des protéines Tau, MAP2, MAP1B et MAP4 et ainsi promeuvent leur détachement et favorisent une instabilité des MT (Barnes *et al.*, 2007; Drewes *et al.*, 1997; Illenberger *et al.*, 1996)(Figure 24). L'inactivation de MARK2 entraîne une stabilisation des MT des neurones en culture et dans des expériences d'électroporation *in utero* a pour conséquences l'accumulation de neurones multipolaires dans la SVZ. Ces kinases sont elles même soumises à un contrôle de leur activité par leur phosphorylation par d'autres kinases comme LKB1.

Ces résultats montrent donc l'importance de la régulation de l'activité des MAP sur l'homéostasie des MT, la morphologie et la migration neuronales (Sapir *et al.*, 2008)

L'apparition de mutations dans les gènes codant les acteurs moléculaires des processus développementaux et cellulaires présentés précédemment, notamment ceux faisant partie du réseau de microtubules et ses protéines associées, peut entraîner l'apparition d'une malformation corticale chez l'homme.

### 3. Les malformations du développement cortical

#### 3.1 Introduction

Les malformations du développement cortical (MDC) représentent une cause majeure d'handicaps mental et moteur ainsi que d'épilepsie sévère. Ces pathologies peuvent être classifiées selon un grand nombre de critères différents en particulier cliniques, radiologiques et génétiques.

En 2005, une première classification a été proposée par Barkovich et coll. prenant en compte les mécanismes neurobiologiques démontrés ou suspectés à l'origine des MDC (Barkovich *et al.*, 2005). Cette classification a été revisitée plusieurs fois et distingue les types de MDC selon qu'elles soient considérées comme étant dues à des défauts (i) de la prolifération des progéniteurs neuronaux ou de la mort neuronale, (ii) de la migration des neurones post-mitotiques ou (iii) de l'organisation post-migratoire des couches corticales.

Parmi les MDC existantes, nous présenterons ici trois groupes de MDC sur la base de l'anomalie corticale principale dont les bases moléculaires ont été beaucoup étudiées ces dernières années dans le laboratoire : les lissencéphalies classiques (anciennement appelées de type I), les hétérotopies et les polymicrogyries. Enfin, nous aborderons les données récentes de génétique et d'imagerie ayant permis l'émergence d'un nouveau concept dans les MDC : les tubulinopathies. Pour une revue plus exhaustive des gènes responsables de MDC et des phénotypes murins associés, se référer au tableau 3.

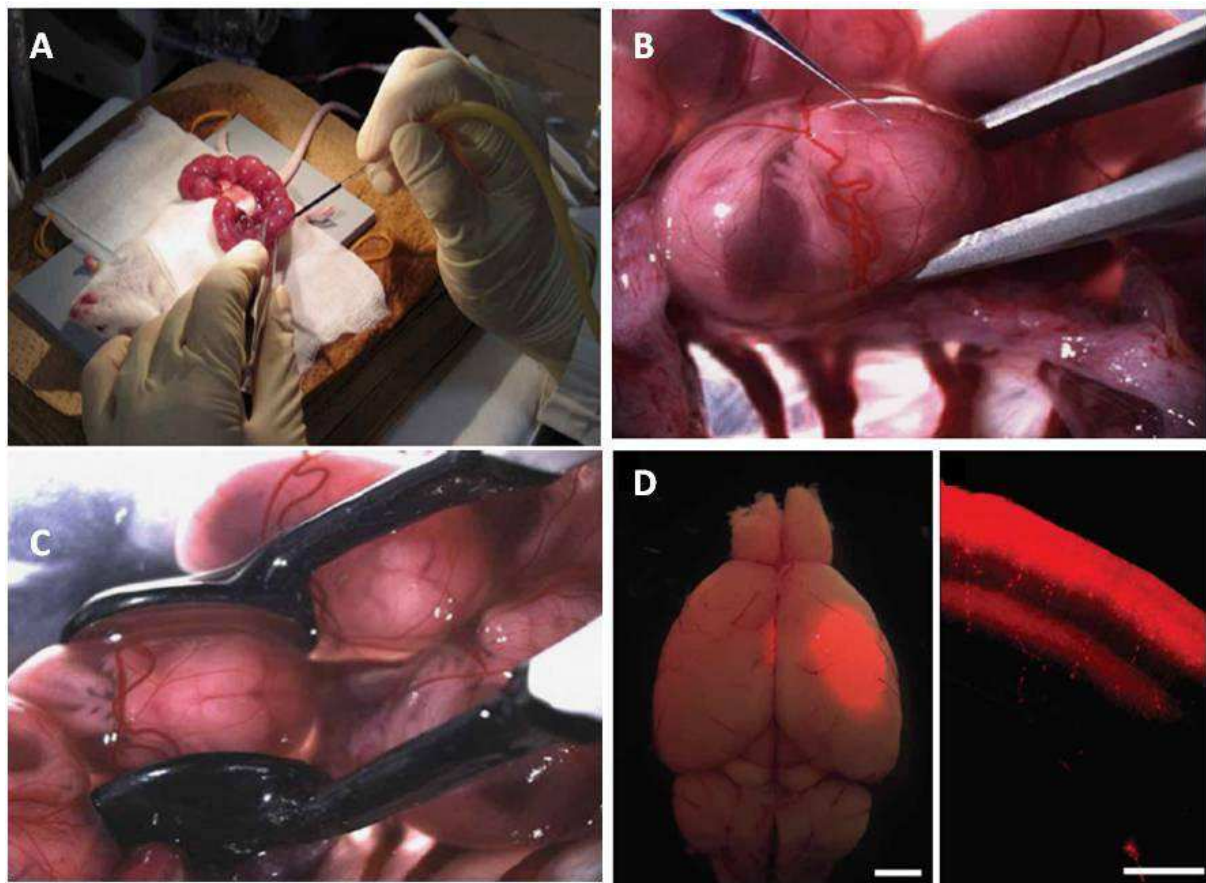
Les avancées technologiques, notamment l'augmentation exponentielle des capacités de séquençage et le perfectionnement de l'outil bioinformatique permettant de les traiter, ont permis une accélération des découvertes des gènes responsables de MDC. Nous résumerons également ici les causes moléculaires de ces pathologies ainsi que les modèles animaux développés pour explorer leurs mécanismes physiopathologiques.

Deux approches ont été développées ces dernières années pour étudier *in vivo*, dans les modèles rongeurs, les fonctions des gènes responsables de MDC : (i) l'approche constitutive avec la génération de KO (Knock Out) ou KI (Knock In) ou par mutagenèse induite par injection d'ENU, et (ii) les approches d'électroporation *in utero* qui permettent d'observer le comportement de cellules spécifiques dans un contexte de cerveau sauvage (Figure 24).

Les modèles murins d'inactivation constitutive des gènes responsables de MDC ont montré des résultats très variables, certains d'entre eux permettant des avancées dans les explorations physiopathologiques des MDC et la compréhension du développement cortical normal, alors que d'autres montrent peu d'expression phénotypique dans le cortex et dans la migration des neurones pyramidaux. Au cours des dernières années, l'électroporation *in utero*, mise au point et décrite par Tabata et Nakajima en 2001, puis par Saito en 2006 (Saito, 2006; Tabata and Nakajima, 2001) (Figure 24, Saito, 2006), a prouvé son efficacité à mimer de



façon aigüe les défauts de migration radiaire retrouvée chez les patients atteints de MDC et à permettre ainsi de disséquer la fonction de ces gènes dans ce processus.



**Figure 24 : Protocole d'électroporation *in utero* chez la souris.**

**(A)** Les cornes utérines d'une femelle anesthésiée et gestante au stade E14-16 sont mis à jour. **(B)** Injection *exo utero* du plasmide d'intérêt dans un ventricule latéral du cerveau de l'embryon. **(C)** Electroporation de la construction plasmidique dans les progéniteurs neuronaux bordant le ventricule grâce à des électrodes en forme de forceps. **(D)** Cerveau à P11 montrant l'expression d'un marqueur fluorescent électroporé à E15.5. La coupe coronale du cerveau montre la migration des neurones fluorescents dans la plaque corticale. (D'après Saito *et al.*, 2006)

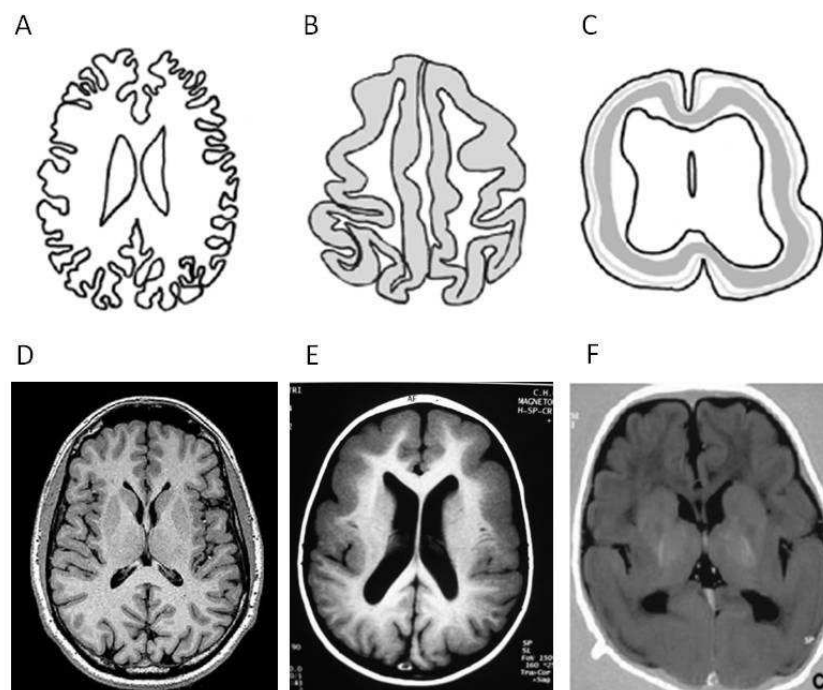


## 3.2 Les lissencéphalies classique ou de type I

### 3.2.1 Caractéristiques

La lissencéphalie classique (de type I) est une pathologie rare caractérisée par un appauvrissement du développement de la gyration corticale. On constate un épaississement du cortex avec une disparition de la lamination normale en six couches remplacé par quatre couches de neurones immatures. Cet aspect traduit l'incapacité des neurones à migrer correctement de la ZV et à atteindre leur destination finale dans les couches corticales, notamment la perte de capacité à migrer à travers les couches de neurones déjà positionnées dans la plaque corticale.

La sévérité de la lissencéphalie classique peut aller de l'appauvrissement de la gyration appelée « pachygyrie » à la disparition complète des circonvolutions : l'agyrie. On distingue également les lissencéphalies classiques selon le gradient antéro-postérieur de la gravité maximum de l'anomalie de la gyration. On parle ainsi de forme « antéro-postérieure » (a>p), quand l'anomalie de gyration est plus importante en frontal, ou de forme « postéro-antérieure » (p>a) lorsque qu'elle est plus présente dans les régions pariéto-occipitales. (Figure 25). Bien qu'à ce jour l'explication neurobiologique de ce gradient reste inconnue, cette distinction permet une orientation vers l'étiologie génétique de ces différentes formes (cf ci-dessous).



**Figure 25 : Pachyrie et agyrie**

(A, B, C) Représentation schématique d'une coupe transversale de cerveau control (A), pachygyrique (B) et agyrique (C) (D'après (Francis *et al.*, 2006)). (D, E, F) Coupe transversal d'IRM d'individu control (D), pachygyrique à prédominance antérieure (E), ou postérieure (F). (D'après (Bahi-Buisson *et al.*, 2008a))

La lissencéphalie classique est souvent associée avec une dilatation des ventricules latéraux, et une agénésie du corps calleux. Les patients atteints de lissencéphalie classique présentent un polyhandicap sévère, une hypotonie massive ainsi qu'une épilepsie précoce pharmaco-résistante. Toutefois avec les progrès de la neuroimagerie fœtale, la proportion de diagnostics anténataux augmente significativement depuis une dizaine d'années. Ainsi, les cas de lissencéphalie classique diagnostiqués en postnatal sont de plus en plus rares et sont principalement des pachygyries.

Lorsque la lissencéphalie est associée à une anomalie de la fosse postérieure ou à d'autres signes cliniques malformatifs tels que des anomalies génitales, on parle de lissencéphalie variante. Leurs étiologies génétiques sont différentes de la lissencéphalie classique

### 3.2.2 Bases Génétiques

Il existe deux gènes majeurs responsables de lissencéphalie classique : *PAFAH1B1* (ou *LIS1*), responsable de la majorité des cas autosomiques sporadiques alors que *DCX* est à l'origine de la plupart des formes familiales liées au chromosome X.

Les lissencéphalies variantes, plus rares, sont également expliquées par des mutations dans deux gènes : *ARX* et *RELN*.

#### ***a- DCX et LIS1***

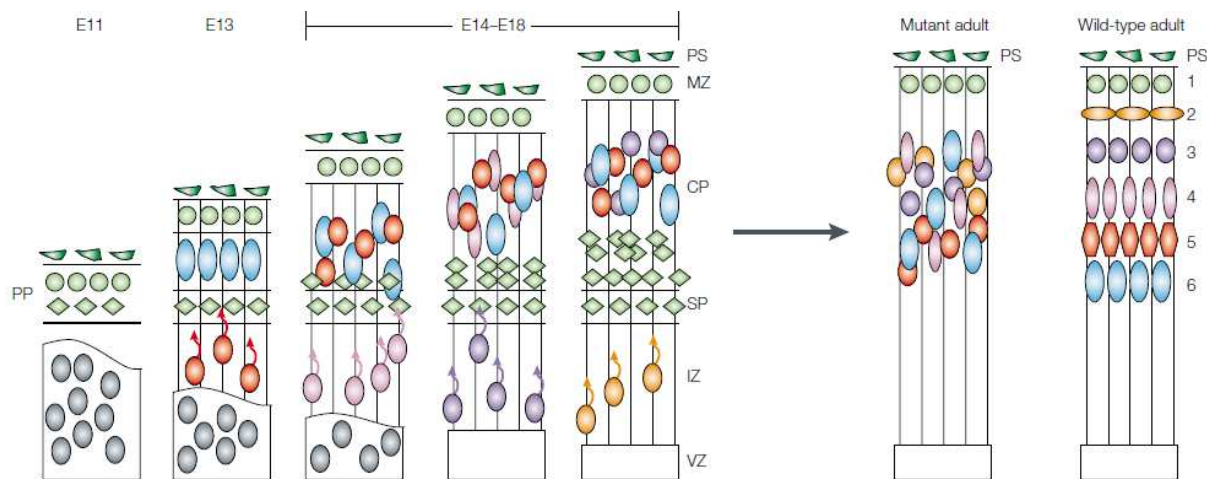
##### **(i) *LIS1***

Les mutations dans les gènes *DCX* et *LIS1*, codant deux protéines associées aux MT, représentent environ 85% des cas de lissencéphalie classique (Pilz *et al.*, 1998). Les lissencéphalies classiques dues à *Lis1* présentent un gradient malformatif p>a, alors qu'à l'inverse les mutations dans *DCX* entraînent une lissencéphalie classique a>p (Dobyns *et al.*, 1999).

La majorité des cas de lissencéphalie classique est due à des mutations dans le gène *PAFAH1B1* (Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha) appelé communément *LIS1* situé sur 17p13.3 (Reiner *et al.*, 1993). Ce gène comprend 11 exons, dont 10 d'entre eux codent la protéine LIS1. Ces mutations sont majoritairement des mutations *de novo* hétérozygotes aboutissant à une perte de fonction (mutations non-sens, du site d'épissage ou délétions intragéniques) situées sur toute la longueur du gène (Saillour *et al.*, 2009).

La large délétion de la région 17p13.3 comprenant le gène *LIS1* et ses gènes contigus (notamment le gène *YWHAE*) entraîne l'apparition du syndrome de Mieller-Dieker (MIM# 247200) associant une agyrie sévère à une dysmorphie faciale (Chong *et al.*, 1997).

Différents modèles de souris invalidés par recombinaison homologue pour le gène *Lis1* ont été créés dont deux modèles Knock-Out et un modèle de la protéine Lis1 tronquée sLis1 présentant une délétion de l'exon 1. Ces modèles montrent une mortalité péri-implantatoire à l'état homozygote, montrant la fonction majeure de ce gène dans le développement embryonnaire. Chez les KO hétérozygotes, la séparation de la pré-plaque et la migration « inside-out » sont maintenues malgré un ralentissement de la formation des six couches corticales. L'étude de l'hétérozygote composite KO/sLis1 n'exprimant qu'une forme tronquée de *Lis1*, montre que la division de la pré-plaque est altérée ce qui résulte en une sous-plaque élargie et diffuse. De plus, la PC est désorganisée sans claire délimitation des différentes couches, phénotype comparable à celle retrouvée chez les patients lissencéphales (Gambello *et al.*, 2003; Hirotsune *et al.*, 1998 ) (Figure 26).

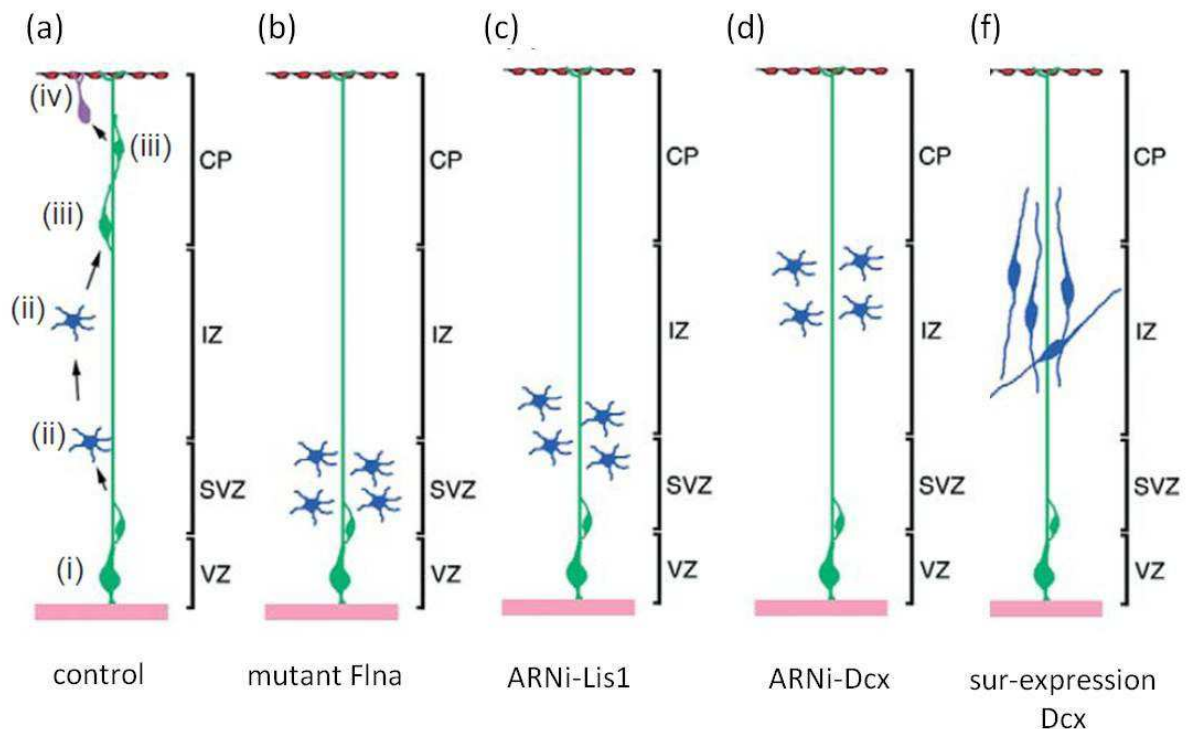


**Figure 26 : Formation de la lamination corticale dans le modèle murin hétérozygote composite KO/sLis1.**

La partition de la pré-plaque (PP) est perturbée ce qui résulte en une sous plaque (SP) étendue et diffuse. La plaque corticale (CP) est désorganisée sans délimitation claire des six couches. (D'après (Gupta *et al.*, 2002))

Les effets pléiotropiques du modèle d'inactivation du gène *Pafah1b1* rendent difficile la détermination exacte du rôle de Lis1 dans la migration radiaire. Les expériences d'électroporation *in utero* de l'ARN sh contre Lis1 ont montré des défauts à la fois du mouvement intercinétique du noyau pendant la division des progéniteurs et de la migration des neurones pyramidaux. Ainsi, de nombreux neurones en migration s'arrêtent en phase multipolaire dans la ZV et ZSV et présente un nombre excessif de branchements secondaires très mobiles de leurs processus (Tsai *et al.*, 2005). A l'inverse la surexpression de Lis1 n'entraîne pas de défauts majeurs de la distribution ou de la morphologie des neurones en migration (Nagano *et al.*, 2004).

Lis1 semble donc avoir un effet sur la sortie de la phase multipolaire et de la transition multipolaire-bipolaire des neurones en migration mais pas sur la capacité de ces cellules à étendre et rétracter leurs multiples processus à ce stade (Figure27).



**Figure 27 : Résumé des phénotypes créés par la surexpression ou l'inhibition de Flna, Lis1 et Dcx sur la morphologie des neurones pyramidaux en migration.**

Le mutant gain de fonction de FilamineA (b), et les ARNi contre Lis1 (c) et Dcx (d) entraînent l'accumulation de cellules multipolaires dans la ZSV ou la ZI alors que la surexpression de Dcx résulte en une bipolarisation excessive des neurones en migration. (D'après LoTurco and Bai, 2006)

## (ii) *DCX*

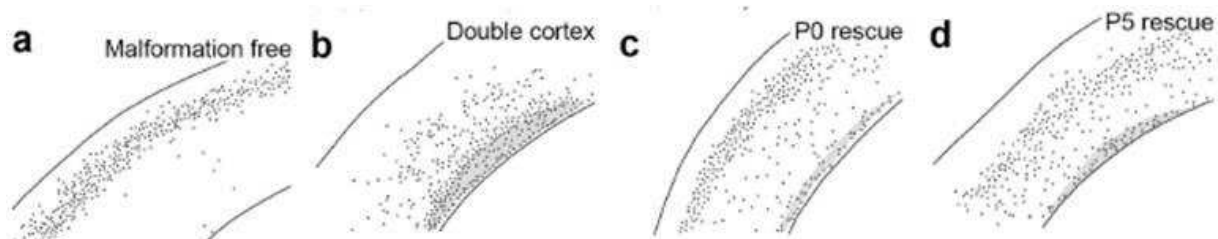
La deuxième forme de lissencéphalie classique est la lissencéphalie liée à l'X due à des mutations dans *DCX* (*Doublecortine*) localisé en Xq22.3 (des Portes *et al.*, 1998; Gleeson *et al.*, 1998). De part sa position sur le chromosome X, les patients males hémizygotes développent une lissencéphalie classique alors que les femmes transmettrices de la mutation hétérozygote ne sont peu ou pas symptomatiques et présentent une hétérotopie laminaire sous corticale grâce au deuxième chromosome X sain. Les mutations sont principalement des mutations faux-sens et non-sens situées pour la majorité dans les deux domaines fonctionnels de liaison aux MT de la doublecortine (N-DC et C-DC). Des données récentes ont montré que les patients présentant une mutation *DCX de novo* présentaient un phénotype plus sévère que ceux ayant hérité leur mutation de leur mère et qu'il existe une corrélation entre la nature de la mutation et la sévérité du phénotype présenté par le patient (Bahi-Buisson *et al.*, 2013).

Le KO murin de Dcx ne présente pas de trouble de migration des neurones pyramidaux corticaux alors que le modèle d'ARNi chez le rat entraîne un arrêt de la migration radiaire créant ainsi une hétérotopie neuronale proche de la malformation observée chez l'homme. Ainsi, les neurones invalidés par ARNi chez le rat s'accumulent dans la ZI alors que la sur-expression de Dcx a pour effet l'adoption d'une morphologie fortement bipolaire (Bai *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2006) (Figure27).

Cette différence serait expliquée par la compensation de Dcx dans le KO par Dclk. En effet, la double invalidation constitutive des deux gènes entraîne un déficit de migration isocorticale (Deuel *et al.*, 2006; Koizumi *et al.*, 2006b). Ce mécanisme de compensation doit être absent chez l'homme.

Des travaux en 2009 de Manent et coll. ont étudié la possibilité de sauver le phénotype de migration neuronale créé par l'ARNi au stade embryonnaire chez le rat par réexpression de Dcx à un stade post natal (stade auquel elle n'est plus exprimée normalement). Pour ce faire, ils ont utilisé un système d'expression conditionnelle de la Doublecortine pouvant être activé de façon temporelle grâce à une construction plasmidique comprenant une cassette stop « floxée » arrêtant la transcription en amont du transcrit Dcx-eGFP. Cette cassette est excisée par l'action de la protéine Cre dont l'action est soumise à l'addition de tamoxifène et permet ainsi l'expression de Dcx. Ils ont ainsi pu montrer que la réexpression de Dcx à P0 permet la redistribution des neurones ectopiques vers les couches supérieures du cortex à P20. De plus, ils ont pu observer que ces neurones ayant réinitié tardivement leur migration présentent une morphologie comparable aux neurones sauvages et que la susceptibilité à l'épilepsie des rats ayant subi l'ARNi disparaît avec la réexpression de Dcx à P0. Toutefois, le sauvetage du phénotype est moins efficace si la réexpression de Dcx se fait plus tardivement à P5 ou P10 (Manent *et al.*, 2009) (Figure28).

Ces résultats sont extrêmement importants puisque qu'ils vont à l'encontre du concept selon lequel les MDC sont des pathologies fixées pour lesquelles aucune thérapie n'est possible et suggèrent qu'une « fenêtre thérapeutique » pourrait être envisageable même après la phase de développement cortical.



**Figure 28 : Sauvetage de l'hétérotopie neuronale due à l'inactivation de Dcx par son réexpression.**

Représentation du positionnement des neurones à P20 exprimant la GFP (a) ainsi qu'un ARNi contre Dcx seul (b) ou en combinaison avec une surexpression du transcrit de Dcx aux stades P0 (c) ou P5 (d). Noter que le sauvetage du phénotype est possible avec la réexpression de Dcx à P0 mais pas à P5. (D'après Manent *et al.*, 2009).

## **b- *ARX* et *RELN***

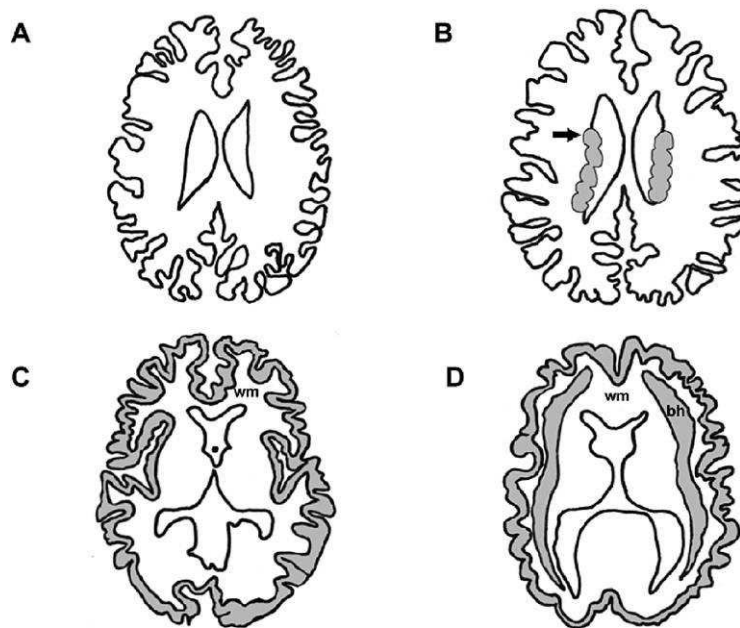
Les cas de mutations dans les gènes *ARX* et *RELN* entraînant des lissencéphalies variantes sont extrêmement rares.

Le gène *ARX* (X-linked Aristaless Related homeobox) a été rapporté comme étant l'un des principaux gènes de déficience intellectuelle non syndromique liée au chromosome X (Poirier *et al.*, 2005; Stepp *et al.*, 2005). Dans de rares cas, des mutations tronquantes d'*ARX* sont à l'origine d'un syndrome XLAG (X-Linked Lissencephaly with Abnormal Genitalia) associant une lissencéphalie, une agénésie du corps calleux, une anomalie des ganglions de la base à des anomalies génitales chez des garçons (Kitamura *et al.*, 2002).

Les mutations dans le gène *RELN* sont encore plus rares que les mutations du gène *ARX*, et rendent compte de lissencéphalie avec hypoplasie cérébelleuse à transmission autosomique récessive (Hong *et al.*, 2000). Modèle spontané d'extinction de la Reelin, une protéine sécrétée par les cellules de Cajal-Retzius présentes dans la zone marginale du cortex, la souris Reeler présente des anomalies corticales dramatiques à l'état homozygote. Les neurones pyramidaux en migration sont incapables de traverser les couches de neurones précédemment générées, ce qui a pour conséquence la formation d'une lamination inversée. Les neurones précoces se trouvent donc dans les couches corticales superficielles et les neurones tardifs dans les couches profondes (Caviness, 1982; Hoffarth *et al.*, 1995; Ogawa *et al.*, 1995; Rice *et al.*, 1998).

## **3.3 Les Hétérotopies**

Le groupe des hétérotopies comprend deux principaux syndromes : les hétérotopies laminaires sous corticales et les hétérotopies nodulaires péri-ventriculaires (Figure 29).



**Figure 29 : Représentation schématique des hétérotopies.**

Images de cerveau normal (**A et C**) et présentant des hétérotopies nodulaires péri-ventriculaires (**B**) indiquées par la flèche ou des hétérotopies laminaires sous-corticales (**D**). (D'après (Francis *et al.*, 2006))

### 3.3.1 Les hétérotopies laminaires sous corticales

#### a- Caractéristiques

Les hétérotopies laminaires sous corticales (HLSC), appelées aussi « double cortex » sont considérées comme étant une forme modérée des lissencéphalies avec lesquelles elles partagent leurs bases génétiques et leurs mécanismes physiopathologiques.

Elles sont caractérisées par une bande de neurones hétérotopiques présents dans la substance blanche à distance du ventricule qui n'ont pas migré dans la plaque corticale (figure 29-D). L'hétérotopie peut être d'épaisseur et d'étendue variables alors que le cortex peut apparaître normal ou avec une gyration simplifiée ou absente dans de rares cas. Les patients atteints de cette forme de MDC présentent une épilepsie pharmaco-résistante associée à une déficience intellectuelle souvent modérée dans 50% des cas, certains patients atteints de la forme la plus modérée de ce syndrome (30%) ne présentent pas de déficience intellectuelle.

#### b- Bases Génétiques

La presque totalité des patients atteints de HLSC sont des femmes qui présentent une mutation hétérozygote dans le gène *DCX*. Les mutations du gène *DCX* représentent 100% des

cas familiaux de HLSC et une forte majorité (53% à 84%) des cas sporadiques (Gleeson, 2000; Matsumoto *et al.*, 2001).

Des rares cas d'individus masculins atteints de HLSC présentent des mutations faux-sens hémizygotiques dont les conséquences protéiques sont prédites comme étant faiblement dommageables ou à l'état de mosaïque somatique (Poolos *et al.*, 2002). Quelques cas de patients masculins présentant des mutations faux-sens parfois mosaïques de *LIS1* ont également été décrits (Pilz *et al.*, 1999).

### 3.3.2 Les hétérotopies nodulaires péri-ventriculaires

#### a- Caractéristiques

Les hétérotopies nodulaires péri-ventriculaires (HNPV) ou hétérotopies sous-épendymaires sont les plus fréquentes des hétérotopies neuronales et représentent la principale cause de MDC découvertes à l'âge adulte dans le cadre d'un bilan d'épilepsie. Elles correspondent à un arrêt précoce de la migration de certaines cellules neuronales et sont caractérisées par la présence d'agrégats nodulaires de groupes neuronaux différenciés qui restent situés, de manière inappropriée, au contact de la face épendymaire des ventricules latéraux (Figure 29-B). En revanche, le reste des neurones migre correctement pour former les six couches du cortex définitif, dont la morphologie est normale. La forme la plus classique est les HNPV bilatérales, de transmission liée à X, et liées dans 50% des cas à une mutation dans le gène de la Filamine A (*FLNA*). Les patientes sont peu symptomatiques et présentent une épilepsie souvent tardive et pharmaco-sensible et une intelligence normale ou plus rarement une déficience intellectuelle légère. Enfin, des anomalies vasculaires et cardiaques peuvent aussi être associées aux anomalies corticales.

#### c- Bases Génétiques

Les mutations pertes de fonction de la Filamine A (*FLNA*), protéine se liant au réseau d'actine, sont responsables de 90% formes familiales de HNPV ne touchant que les filles et de 50% des cas sporadiques. Quelques cas de garçons portant une mutation *FLNA* sont décrits; dans ces derniers cas, les effets sur la protéine prédits sont une perte de fonction partielle (Sheen *et al.*, 2001).

Feng et coll. ont montré que le modèle hémizygotique de l'inactivation de *Flna* entraîne en une létalité embryonnaire avec des hémorragies généralisées, des défauts structuraux cardiaques importants et des anomalies de jonctions d'adhérence inter-cellulaire dans de nombreux types tissulaires. Au niveau du système nerveux central, le modèle d'inactivation constitutive possède un cerveau de plus petite taille et un cortex plus fin. Toutefois, il ne montre pas

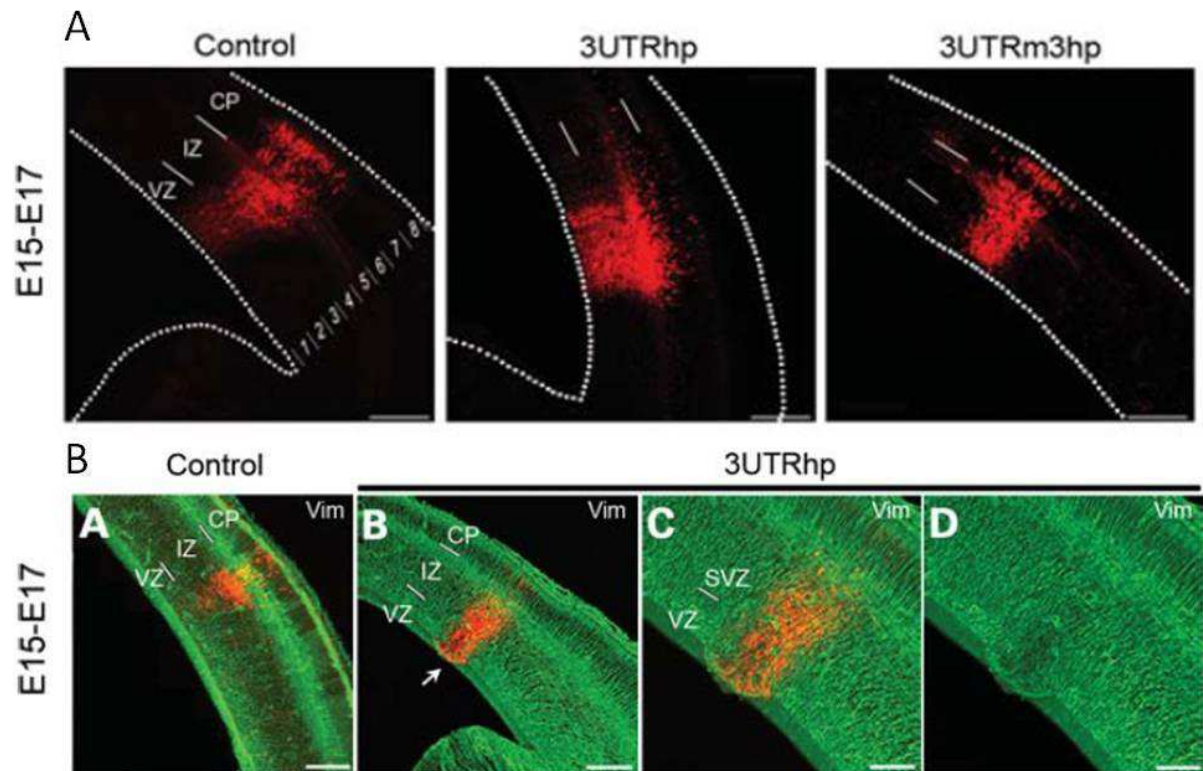


d'accumulation de neurones dans les zones ventriculaires ou sub-ventriculaires (Feng *et al.*, 2006).

Dans les expériences d'électroporations *in utero*, la sur-expression de Flna réduit le nombre de cellules multipolaires dans la ZAM. A l'inverse la diminution de l'expression de Flna cause l'accumulation de cellules au stade multipolaire et une incapacité à retrouver la morphologie bipolaire des neurones en migration. Enfin, l'expression d'un dominant négatif de Flna a également pour conséquence un arrêt de la migration dans la ZSV bien que le stade multipolaire semble préservé avec des cellules qui étendent et rétractent normalement leur processus (Nagano *et al.*, 2004) (Figure 27).

Dcx et Flna entraînent donc des phénotypes cellulaires comparables d'augmentation et de diminution de la population de neurones multipolaires suivant leur extinction ou leur sur-expression. Toutefois, une des différences entre les deux conditions est la zone où se trouvent les cellules multipolaires ou bipolaires. Les modifications de l'expression de Flna affectent les cellules à proximité de la ZV, alors que celles de Dcx ont des effets sur les neurones dans la ZI. Cette différence spatiale correspond au patron d'expression de chaque gène dans le mur cortical, puisque Flna est exprimé dès la ZV alors que Dcx n'est exprimé qu'après la sortie des neurones de la ZV.

Une autre étude récente a montré également que l'électroporation d'un ARNi dirigé contre Flna entraîne une formation d'une hétérotopie neuronale importante dans la ZI. Ce défaut est dû à l'altération des fibres apicales des cellules de la glie radiaire dans la ZV perturbant la migration des neurones, alors que les pieds de la glie semblent quand à eux préservés (Figure 30). De plus le cycle cellulaire de ces progéniteurs est diminué dans cette condition ayant pour conséquence une diminution du nombre de neurones générés dans la ZV (Carabalona *et al.*, 2012).



**Figure 30 : Effet de l'électroporation *in utero* de l'ARNsh anti-Flna sur la migration radiaire.**

**(A)** Arrêt de la migration radiaire due à l'ARNsh anti-Flna deux jours après électroporation à E15.5 . **(B)** Le marquage de la Vimentine révèle des défauts drastique des fibres apicales de la glie radiaire. (D'après Carabalona *et al.*, 2012)

Des mutations autosomiques récessives dans un gène mineur *ARFGEF2* sont responsables d'exceptionnelles formes d'hétérotopies péri-ventriculaires avec microcéphalie, hypoplasie du corps calleux et une atrophie corticale progressive. Cliniquement les patients présentent une encéphalopathie sévère progressive pouvant être associée à une cardiomyopathie (Sheen *et al.*, 2004; Tanyalcin *et al.*, 2013).

### 3.3 Les polymicrogyries

Les Polymicrogyries (PMG) représentent le groupe de MDC le plus répandu. Elles sont connues depuis de nombreuses années (première observation en 1915 par Bielschowsky) et leurs caractéristiques cliniques et radiologiques sont bien décrites. Toutefois, leurs hétérogénéités histologique et topographique ainsi que la diversité de leur étiologie en font un groupe de malformations très complexe.

### 3.3.1 Caractéristiques

Les PMG proviennent d'un développement anormal des couches corticales et de la formation de multiples petits gyri. Le terme polymicrogyrie fait référence à un diagnostic histologique d'anomalie de la lamination associée à un excès de sillons (Raymond *et al.*, 1995). Le cortex apparaît anormalement épaissi comportant un nombre excessif de petits gyri partiellement fusionnés avec des sillons peu profonds. Au plan histologique, plusieurs types sont décrits, tous ayant en commun la perte de l'organisation laminaire normale en 6 couches avec une désorganisation de la formation des sulci et une fusion de la couche moléculaire (couche I). L'examen d'une cohorte de 18 cas fœtaux atteints de PMG a montré l'existence simultanée chez la majorité d'entre eux de PMG à deux, quatre ou six couches corticales montrant ainsi que le type de stratification de la PMG n'est pas un bon critère différentiel des types de PMG. Des immuno-marquages de différents marqueurs neuronaux ont montré une morphologie neuronale préservée mais une diminution globale du nombre de neurones présents dans la PMG (notamment dans les couches profondes) comparé au cortex sain adjacent (Judkins *et al.*, 2012).

Les PMG sont considérées comme faisant partie du 3ème groupe de la classification de Barkovich caractérisé par des malformations secondaires à une anomalie de développement post-migratoire. Cependant, des études physiopathologiques (décrites ci-dessous) ont pu montrer des anomalies de la migration neuronale dans des modèles murins inactivant les gènes responsables de PMG. En outre, certains de ces gènes sont spécifiquement exprimés dans les progéniteurs neuronaux faisant supposer que d'autres mécanismes tels qu'une altération de la prolifération des progéniteurs neuronaux ou de la migration neuronale pourrait rendre compte d'au moins certaines formes de PMG.

Les performances croissantes de l'imagerie par résonance magnétique ont permis la multiplication des diagnostics de PMG devenant, du fait de la variété des distributions topographiques différentes, un groupe de malformations extrêmement hétérogènes. On peut ainsi distinguer des PMG focales, multifocales ou diffuses. Les PMG multifocales pouvant être unilatérales, bilatérales symétriques ou bilatérales asymétriques (Figure 31). Les syndromes de PMG les plus fréquents sont les PMG bilatérales péri-sylviennes et fronto-pariétales.

Les phénotypes cliniques des patients atteints de PMG s'étendent de symptômes neurologiques focaux (hémiparésie ou épilepsie partielle) à des troubles développementaux plus sévères (encéphalopathie sévère et/ou une épilepsie pharmaco-résistante). La gravité des atteintes cliniques est en corrélation avec l'étendue corticale de la malformation.

Les causes de PMG sont multiples incluant des infections congénitales (particulièrement les infections au cytomégalovirus), des ischémies intra-utérines ou des causes génétiques (chromosomiques ou monogéniques).

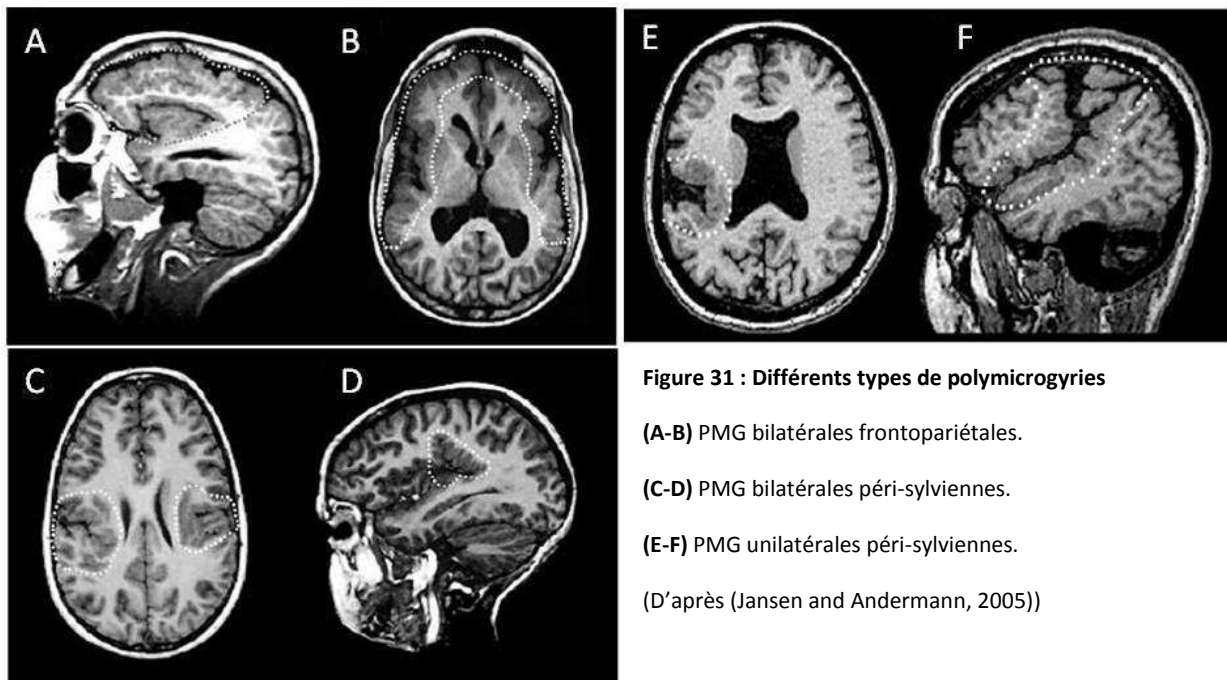


Figure 31 : Différents types de polymicrogyries

(A-B) PMG bilatérales frontopariétales.

(C-D) PMG bilatérales péri-sylviennes.

(E-F) PMG unilatérales péri-sylviennes.

(D'après (Jansen and Andermann, 2005))

### 3.3.2 Bases Génétiques

#### a- Les PMG bilatérales péri-sylviennes.

Les PMG bilatérales péri-sylviennes (PBP) sont observées dans les régions de la vallée sylvienne des deux hémisphères cérébraux. Il s'agit de la forme de PMG la plus fréquente. Ce syndrome peut avoir une occurrence sporadique ou familiale. A ce jour plusieurs locus associés aux PBP ont été mis en évidence :

- Un locus de 5,2Mb en Xq28 a été identifié grâce à une étude de liaison sur cinq différentes familles de PBP présentant exclusivement des garçons atteints (Villard *et al.*, 2002).
- La délétion de la région 22q11.2 est fréquemment associée à une PBP de sévérité variable qui peut également être asymétrique avec une prédisposition à toucher l'hémisphère droit (Robin *et al.*, 2006).
- Une étude des réarrangements chromosomiques présents dans une cohorte de 29 patients a mis en évidence de nombreux loci (1p36.3, 2p16.1-p23, 4q21.21-q22.1, 6q26-q27, 21q21.3-q22.1, 1q44 et 18p) à pénétrance incomplète possiblement impliqués dans l'apparition de PBP (Dobyns *et al.*, 2008). Ces données imposent de rechercher les variations du nombre de copie chez les patients présentant une PBP et encouragent à apporter une attention particulière à ces régions lors des travaux génétiques à venir de recherche de nouveaux gènes responsables de PBP.

- Enfin, à ce jour un seul gène a été impliqué dans les PBP, il s'agit d'une mutation faux sens du gène SRPX2 (Sushi repeat-containing protein) retrouvée chez un patient présentant une PBP associée avec une épilepsie (Roll *et al.*, 2006).

L'inactivation du gène *Srpx2* in utero chez le rat entraîne un retard de la migration avec une augmentation de neurones pyramidaux dans les zones ventriculaire et intermédiaire. Ces neurones présentent une diminution de leur vitesse de migration ainsi qu'un défaut d'orientation de leur processus apical et une diminution de leur arbre dendritique. De plus, la sous-expression de *Srpx2* entraîne une diminution de l'acétylation des MT des cellules électroporées (et donc des MT stables) par un mécanisme non encore élucidé. L'originalité de cette étude est de montrer que l'injection chez la mère de la molécule Tubacine, un inhibiteur de la déacétylase des tubulines, a un effet protecteur de l'inhibition de *Srpx2* chez les embryons. En effet, sous l'effet de cette drogue, les neurones migrent correctement à la PC et montrent des caractéristiques électro-physiologiques identiques à celles des neurones sauvages (Figure 32). Cette étude suggère ainsi l'effet thérapeutique d'une molécule sur les conséquences de l'inactivation d'un gène de MDC (Salmi *et al.*, 2013).

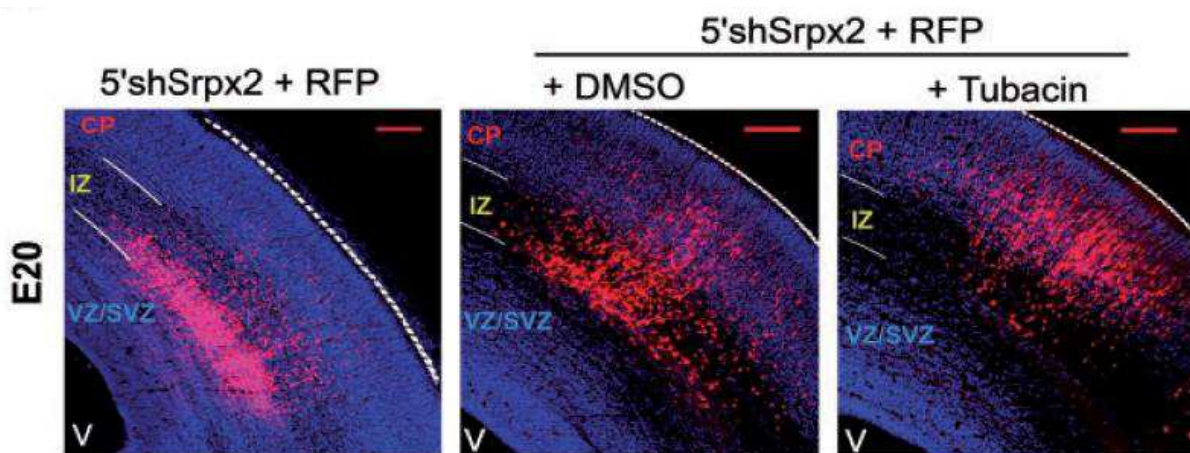


Figure 32 : Sauvetage du phénotype de migration radiaire due à l'ARNsh anti-Srpx2 par la Tubacine.

Distribution des neurones pyramidaux à E20 après électroporation *in utero* au jour E16 de l'ARNsh anti-Srpx2 seul (A) ou avec administration maternelle de DMSO (B) ou de Tubacin (C). (D'après (Salmi *et al.*, 2013))

## b- Les PMG bilatérales fronto-pariétales

Les PMG bilatérales fronto-pariétales (PBFP) sont un autre syndrome de PMG bien identifiable de transmission autosomique récessive. Dans ce syndrome, les patients présentent un retard de développement global, une épilepsie, une PMG bilatérale affectant de façon préférentielle les régions fronto-pariétales ainsi qu'une ventriculo-mégalie et des anomalies du tronc cérébral et du cervelet. La cause moléculaire dans la grande majorité des patients atteints de ce syndrome est une mutation à l'état homozygote dans le gène *G-protein coupled receptor 56 (GPR56)* codant un récepteur transmembranaire qui interagit avec

la matrice extracellulaire et qui a notamment une fonction dans l'adhésion cellulaire. Les mutations du gène *GPR56* sont principalement des mutations faux-sens situées dans le domaine extracellulaire (Piao *et al.*, 2004).

L'étude anapathologique du seul cas fœtal décrit de mutation *GPR56* a montré des brèches dans la membrane basale et un ancrage anormal des pieds de la glie à celle-ci. On observe alors une migration excessive de neurones dans les espaces méningés qui rappelle les phénotypes similaires observés dans les lissencéphalies de type II ou pavimenteuse. Ce défaut de migration excessive est aussi retrouvé dans les structures pontique et cérébelleuse (Bahi-Buisson *et al.*, 2010).

On peut supposer que ces mutations sont probablement des pertes de fonctions car le phénotype du KO murin de *Gpr56* est assez comparable à l'humain avec des anomalies de la lamination corticale ainsi que la présence de neurones ayant migré au delà de la limite de la membrane basale qui est fragmentée. Ces anomalies se retrouvent à la fois dans le cortex cérébral et dans le cortex cérébelleux (Koirala *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2008).

### **c- Autres formes de PMG**

Des rares mutations dans les gènes spécifiques des cellules de la glie radiaire et des progéniteurs intermédiaires *PAX6* et *TBR2* ont été identifiées dans d'exceptionnelles formes de PMG.

Les mutations hétérozygotes dans *PAX6* peuvent entraîner l'apparition d'un spectre de PMG allant d'une forme unilatérale du lobe temporal à une forme diffuse associée à des anomalies de la commissure antérieure et des anomalies oculaires (Mitchell *et al.*, 2003; Sisodiya *et al.*, 2001). On retrouve chez les souris *Pax6*<sup>-/-</sup> une augmentation du nombre de neurones exprimant la Reelin ou la Calrétinine et une hétérotopie neuronale sous-corticale (Kroll and O'Leary, 2005; Stoykova *et al.*, 2003).

Une translocation équilibrée homozygote des chromosomes 3p et 10p entraînant l'extinction de l'expression de *TBR2* a été retrouvée chez un patient présentant une microcéphalie, une PMG diffuse ainsi qu'une agénésie du corps calleux et une ventriculomégalie (Baala *et al.*, 2007).

## **3.3 Les Tubulinopathies**

Le concept de « Tubulinopathies » regroupe un spectre large de malformations pour lesquelles une mutation a été retrouvée ces dernières années dans des gènes codant différentes sous unités de tubulines. Les phénotypes observés sont variables mais s'inscrivent dans les formes de MDC décrites précédemment. Ils sont parfois intriqués, pouvant se chevaucher et partageant également des caractéristiques spécifiques

radiologiques. La découverte de ces mutations confirme, après l'implication des gènes *DCX* et *LIS1*, l'importance des MT dans le développement cortical et fait émerger un nouveau groupe de pathologies sur des bases génétique et radiologique. Toutes les mutations décrites à ce jour sont des faux sens hétérozygotes dont la grande majorité est *de novo*.

Les MDC relatives à des mutations dans les gènes *TUBB3* et *TUBG1* seront brièvement abordées ici et plus largement développées dans la partie résultats de cette thèse.

Toutefois, le spectre clinique associé aux mutations dans les tubulines est parfois plus large que celui des MDC et peut comporter des troubles congénitaux de mobilité oculaire ou des neuropathies motrices

### 3.3.1 *TUBA1A*

Le premier gène codant une tubuline impliqué dans les MDC code la sous-unité  $\alpha 1A$  (*TUBA1A*). Dès les premières descriptions de ces mutations, il a été observé un large spectre de MDC, avec des cas de lissencéphalie classique avec un gradient p>a et des formes moins sévères caractérisées par une pachygyrie à prédominance péri-sylvienne.

Cette forme de MDC assez proche de la lissencéphalie classique liée aux mutations de *LIS1*, présente malgré tout des signes distinctifs. En effet, les MDC liées à *TUBA1A* sont associées de façon quasi constante à une microcéphalie, une dysmorphie des ganglions de la base caractérisée par une diminution ou une absence du bras antérieur de la capsule interne des ganglions de la base ainsi qu'à des anomalies du corps calleux, du cervelet et du tronc cérébral (Bahi-Buisson *et al.*, 2008b; Breuss *et al.*, 2012; Keays *et al.*, 2007 ; Morris-Rosendahl *et al.*, 2008; Poirier *et al.*, 2007) (Figure 34).

Plus récemment, le spectre phénotypique des MDC dues à *TUBA1A* fut élargi par la description de patients présentant des PMG atypiques de topographie péri-sylvienne (Cushion *et al.*, 2013; Jansen *et al.*, 2011; Poirier *et al.*, 2012; Zanni *et al.*, 2013).

Le modèle murin « Jenna » présentant une mutation hétérozygote faux-sens p.Ser140Gly de *Tuba1a* généré par le mutagène ENU (N-nitroso-N-éthylurée), comporte une désorganisation modérée des couches corticales II, III et IV mais surtout une bande de neurones hétérotopiques au niveau de l'hippocampe rappelant fortement le phénotype observé dans le KO de *Dcx* (Figure 33). Les études comportementales effectuées sur ce modèle révèlent, une hyper activité, des défauts de la mémoire spatiale ainsi que des troubles de l'anxiété, observations corroborant les anomalies morphologiques puisqu'il s'agit de fonctions sous-tendues par des réseaux neuronaux hippocampiques (Keays *et al.*, 2007).



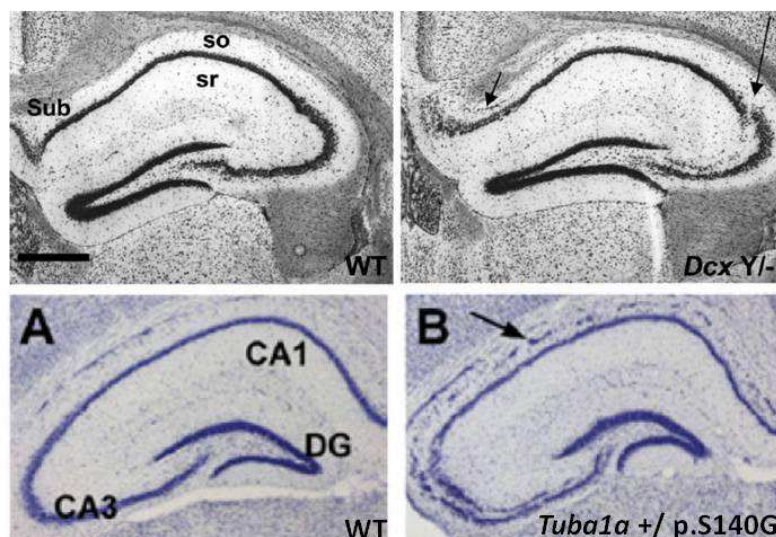


Figure 33 : Anomalies morphologique de l'hippocampe des modèles murins *Dcx* et *Tuba1a*.

(D'après (Kappeler *et al.*, 2007) et (Keays *et al.*, 2007))

### 3.3.2 *TUBB2B*

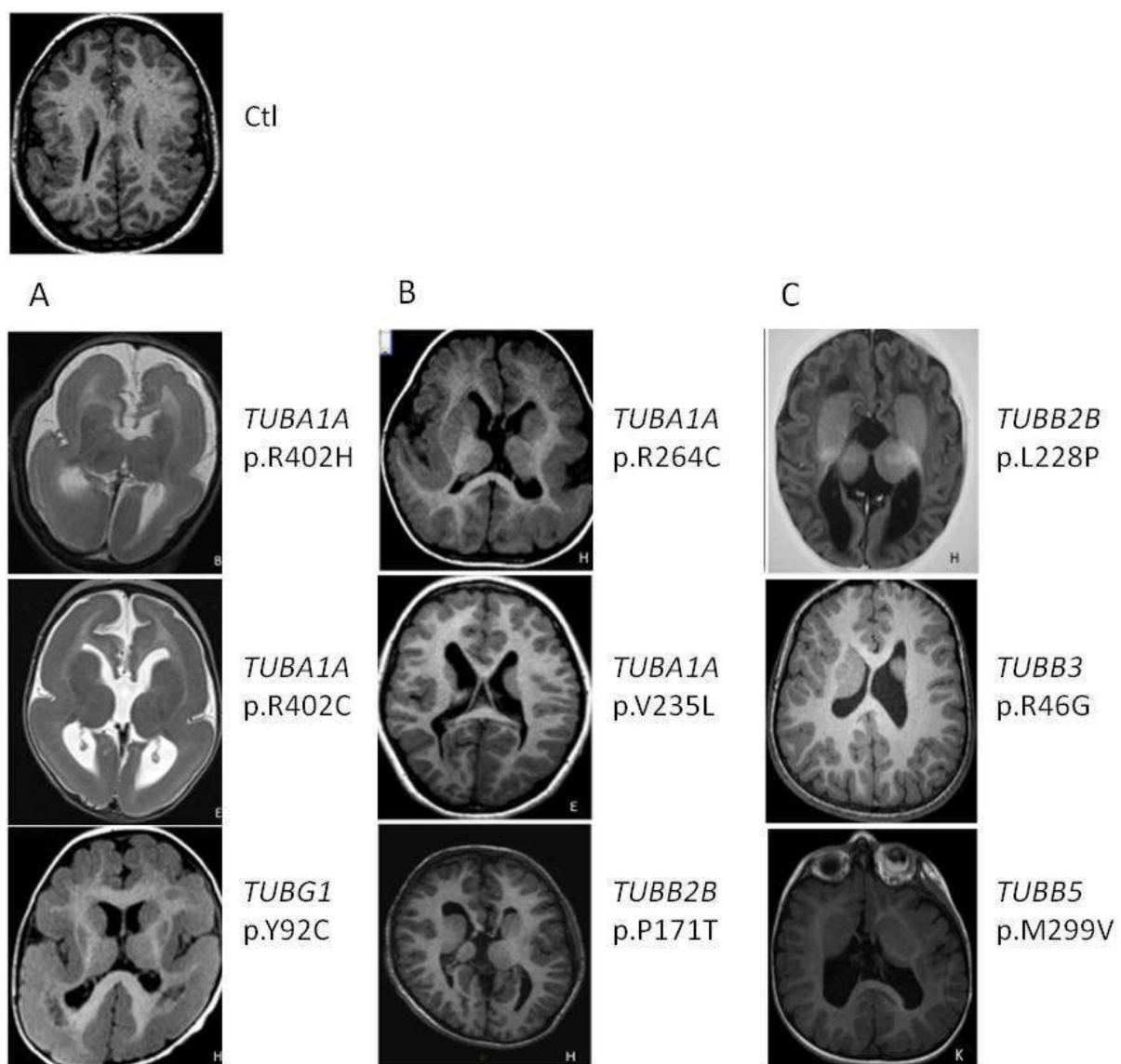
Des mutations dans le gène *TUBB2B* codant la sous-unité tubuline  $\beta 2B$  ont dans un premier temps été décrites chez un groupe de patients présentant des PMG asymétriques bilatérales prédominantes dans les lobes frontaux et temporaux (Figure 34). De façon similaire à *TUBA1A*, on retrouve aussi chez ces patients un dysmorphisme des ganglions de la base, une agénésie du corps calleux, une dysgénésie du tronc cérébral et des anomalies cérébelleuses (Jaglin *et al.*, 2009). Secondairement, des mutations de *TUBB2B* ont été identifiées dans des cas de PMG symétriques, avec parfois une schizencéphalie (caractérisée par une fente uni- ou bilatérale étendue du ventricule latéral à la surface du cortex cérébral), élargissant ainsi le spectre des MDC dues à des mutations dans ce gène. Dans tous les cas, il existe les autres anomalies caractéristiques des tubulinopathies précédemment décrites dans les cas de tubulinopathies *TUBA1A* (c'est-à-dire : microcéphalie, anomalies des ganglions de la base et du cervelet). Il est intéressant de noter que parmi cette seconde cohorte de patients mutés pour le gène *TUBB2B*, un patient présentait une agyrie du cortex ainsi qu'une bande hétérotopique bilatérale de cortex, confirmant un chevauchement des MDC associées aux mutations *TUBA1A* et *TUBB2B* (Cushion *et al.*, 2013).

La mutagenèse aléatoire par injection du mutagène gamétique ENU a permis de générer un modèle murin présentant une mutation p.Asn247Ser dans le gène *Tubb2b*. Les souris homozygotes présentent un cortex très fin associé à une forte dilatation ventriculaire et ne survivent pas à la période néonatale. Les défauts corticaux sont dus à une très forte mort cellulaire qui contre balance une augmentation de la division cellulaire observée dans la ZV/ZSV et la ZI. L'étude des souris hétérozygotes pour la mutation, qui sont viables et fertiles, a montré quelques défauts subtils d'organisation des neurones corticaux,



notamment une diminution significative des neurones exprimant le marqueur des interneurones Gad67 suggérant un défaut de migration de ces neurones ou de leur production dans les éminences ganglionnaires. Il a aussi été mis en évidence une hyperactivité chez les souris hétérozygotes (Stottmann *et al.*, 2013).

L'inactivation *in utero* du gène *Tubb2b* chez le rat altère la migration neuronale alors que sa surexpression n'entraîne aucune conséquence. Jaglin et coll. ont testé la complémentation du phénotype migratoire par la surexpression de deux mutations retrouvées dans des cas de MDC chez l'homme. Ces deux mutants sont incapables de restaurer un patron de migration correct, alors que la surexpression de la mutation p.Ser172Pro n'entraîne pas de retard de migration (Jaglin *et al.*, 2009).



**Figure 34 : Spectre des MDC observées dans les patients présentant des mutations dans les sous-unités tubulines.**

Agyrie (A) Pachyrie(B) et Polymicrogyries (C) associées à des mutations des gènes TUBA1A, TUBB2B, TUBB3 et TUBG1

### 3.3.3 TUBB5

Des mutations dans le gène *TUBB5* ont été décrites chez trois patients présentant des anomalies corticales moins sévères allant d'une simplification gyrale à une PMG focale associées à une microcéphalie (Breuss *et al.*, 2012) (Figure 34).

L'inactivation *in utero* chez la souris de la sous-unité tubuline  $\beta 5$  entraîne une accumulation légère de neurones dans la ZI concomitante à une diminution de ceux présents dans la PC. De plus, l'inactivation de *Tubb5* a un effet délétère sur la division des cellules de la glie radiaire qui présentent une augmentation de la longueur du cycle cellulaire suggérant une diminution du nombre de neurones générés. Cette observation est en adéquation avec la forte microcéphalie présente chez deux patients porteurs de mutation dans *TUBB5*. La surexpression de ces deux mutants *in utero* montre le même type de phénotype de division et de migration que ceux générés par l'ARN sh (Breuss *et al.*, 2012).

### 3.3.4 TUBB3

Des mutations dans le gène *TUBB3*, dont la protéine est considérée comme un marqueur des neurones post-mitotiques et appelé Tuj1 chez la souris (Menezes and Luskin, 1994), ont été retrouvée dans 7 familles incluant un cas fœtal. Elles se présentent à l'état hétérozygote, sauf un cas homozygote et peuvent être *de novo* ou héritées selon un mode autosomique dominant. Tous les patients ont en commun des anomalies du développement cortical incluant des PMG, des désorganisations ou des simplifications gyrales associées à une microcéphalie et à des anomalies du corps calleux, du tronc cérébral, du cervelet ainsi que des ganglions de la base (Poirier *et al.*, 2010) (voir la partie Résultats) (Figure 34).

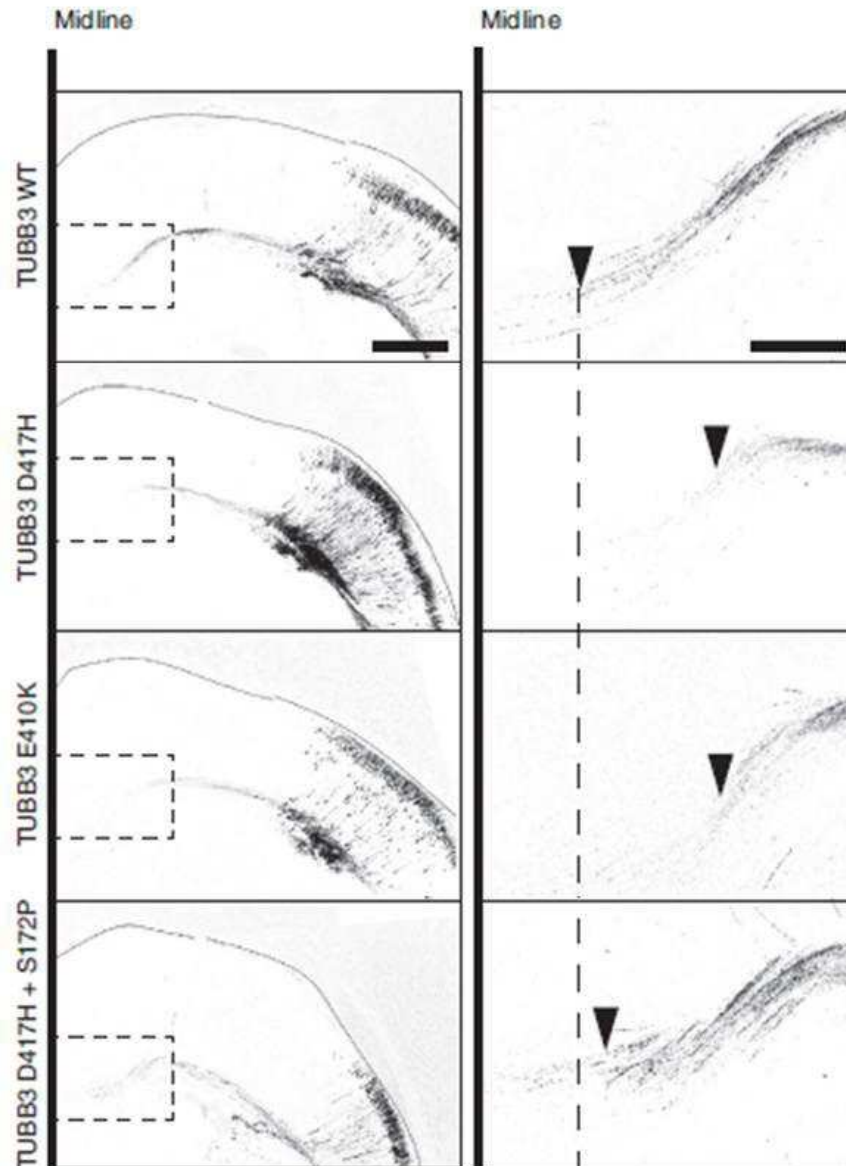
Différentes mutations de *TUBB3* ont été également mises en évidence en 2010 par Tieschfield et coll. dans un syndrome de fibrose congénitale des muscles extra-oculaires de type 3 (CFEOM3). Il s'agit d'une pathologie rare de mobilité oculaire dans lequel les patients présentent des paupières tombantes et des mouvements des yeux restreints. Dans cette étude huit patients présentent des mutations hétérozygotes différentes dans *TUBB3* associées à un CFEOM3 uniquement ou accompagné d'autres signes neurologiques tels que des anomalies du corps calleux, du vermis cérébelleux et une dysmorphie des ganglions de la base. Ces anomalies cérébrales sont également comparables aux tubulinopathies liées à *TUBA1A* et *TUBB2B* précédemment décrites. De plus, certains patients présentent également des neuropathies périphériques (Tischfield *et al.*, 2010).

Le modèle murin KI, porteur d'une mutation à l'état homozygote p.ARG262Cyst retrouvée chez un des patients, reproduit le défaut d'innervation des muscles oculaires du syndrome CFEOM3 humain et montre des défauts d'axonogenèse au niveau du corps calleux et de la commissure antérieure avec une cytoarchitecture corticale normale. Les MT des neurones

KI/KI sont également caractérisés par un défaut de stabilité ainsi qu'une diminution de l'interaction avec la protéine motrice Kif21a (Tischfield *et al.*, 2010).

Très récemment, des mutations dans *TUBB2B* ont été rapportées dans une famille de patients associant CFEOM à des PMG diffuses bilatérales, rajoutant encore à la complexité de la définition clinique des tubulinopathies (Cederquist *et al.*, 2012).

Les conséquences sur l'axonogénèse des mutations de *TUBB3* ainsi que celles retrouvées dans *TUBB2B* ont été explorées dernièrement par surexpression dans des neurones corticaux en culture et *in vivo* par électroporation *in utéro* chez la souris. Les résultats de cette étude exhaustive montrent que deux mutants responsables de CFEOM3 associés à une neuropathie (p.Glu410Lys et p.Asp417His) entraînent un défaut du transport axonal du à une perte de liaison à certaines kinésines et une incapacité des axones des neurones électroporés à traverser la ligne médiane au niveau du corps calleux. Les auteurs montrent que ces mutations entraînent un effet délétère sur la fonction de TUBB3 par le biais d'un changement de la charge électrique globale de l'hélice 12 située dans le domaine de liaison aux kinésines de la protéine. De plus, ils démontrent que ces mutations agissent quelque soit la sous-unité  $\beta$  mutée. Enfin, ils démontrent que lorsque l'on empêche la mutation de s'intégrer aux MT par l'ajout d'une deuxième mutation (p.Ser172pro) qui abolie l'incorporation de la protéine aux MT, on constate que les phénotype observés précédemment sont reversés (Niwa *et al.*, 2013) (Figure 35). Les résultats observés dans cette dernière étude tendent à privilégier un effet dominant négatif des mutations étudiées, toutefois les mécanismes d'actions des mutations dans les gènes des tubulines (haplo-insuffisance, dominant négatif ou gain de fonction) restent encore une question débattue.



**Figure 35 : Défauts d'axonogenèse dues à la sur-expression de mutants de TUBB3 par un mécanisme de dominant négatif.**

La sur-expression *in utero* de deux mutations de TUBB3 (p.D417H et p.E410K) responsables de FCEOM3 entraîne une impossibilité des axones à traverser la ligne médiane. Ces deux mutations s'incorporent au réseau de microtubule. L'ajout de la mutation p.S172P au mutant TUBB3 p.D417H entraîne une perte de sa capacité à s'intégrer au MT et fait disparaître le phénotype axonal précédemment décrit. (D'après (Niwa *et al.*, 2013))

### 3.3.5 *TUBB4A*

Des mutations faux sens hétérozygotes du gène *TUBB4A* ont dernièrement été impliquées dans l'apparition chez deux familles australiennes d'un syndrome de dysphonie appelé « Whispering Dystonia » (mutations p.Arg2Gly et p.Ala271Thr) ainsi que dans un syndrome d'hypomyélinisation associé à des anomalies des ganglions de la base et du cervelet (mutation p.Asp249Asn) (Hersheson *et al.*, 2012; Lohmann *et al.*, 2012).

### 3.3.6 *TUBG1*

Le gène de la tubuline  $\gamma$  1 est le dernier membre de la famille des tubulines à avoir été impliqué dans les MDC. *TUBG1* est un des deux gènes codant les tubulines gamma, composants structurels du centrosome. En 2013, Poirier et coll. ont pu identifier 3 mutations hétérozygotes *de novo* chez des patients présentant un spectre de pachygyrie à prédominance postérieure. Deux patients présentent un épaississement important du cortex dans les régions pariéto-occipitales alors que l'IRM du troisième patient moins sévère montre que la pachygyrie est plus modérée avec un aspect d'hétérotopie laminaire sous corticale postérieure (Poirier *et al.*, 2013). Aucun de ces 3 patients ne présente d'anomalies du tronc cérébral, du cervelet ou des ganglions de la base, ce qui les différencie des phénotypes communs observés dans les tubulinopathies liées à des mutations dans les gènes codant les tubulines  $\alpha$  ou  $\beta$ .

Toutes ces données montrent donc un large spectre de malformations développementales dues à des mutations dans les gènes de sous-unités tubulines. Certains phénotypes peuvent se chevaucher, notamment dans les formes de lissencéphalies et de PMG retrouvées à la fois dans les tubulinopathies liées à *TUBA1A* et *TUBB2B* montrant que les frontières de ces syndromes bien compartimentés à leurs origines tendent à disparaître. De plus, une association de critères malformatifs constants dans tous les syndromes a émergé: une microcéphalie associée à la dysmorphie des ganglions de la base et à des anomalies cérébelleuse et du tronc cérébral. Cette association de critères a fait naître le concept de tubulinopathie qui permet une meilleure orientation du diagnostic moléculaire de ces pathologies.

Toutefois, des études complémentaires sont nécessaires pour mieux délimiter l'étendue du spectre de ces pathologies et leurs chevauchements.

**Tableau 3 : Récapitulatif des gènes responsables de MDC et phénotypes murins associés**

| Malformations du développement cortical                                   | Gènes           | Fonction protéique                | Anomalies du SNC des modèles murins constitutifs (KO/ENU/Spontané)                                                             | Anomalies du SNC des modèles murins ARNi <i>in utero</i>                                                                                                                         | Références                                                                                                               |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Microcéphalie                                                             |                 |                                   |                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                          |
| Microcéphalie primaire héréditaire                                        | <i>MCPH1</i>    | Condensation des chromosomes      | Microcéphalie<br>Apoptose<br>Défaut de division des progéniteurs neuronaux                                                     | /                                                                                                                                                                                | (Jackson <i>et al.</i> , 2002)*<br>(Liang <i>et al.</i> , 2010)<br>(Gruber <i>et al.</i> , 2011)                         |
| Microcéphalie primaire héréditaire                                        | <i>ASPM</i>     | Protéine liée au fuseau mitotique | Microcéphalie<br>Dérégulation du plan de clivage des progéniteurs apicaux                                                      | Diminution de la prolifération des progéniteurs<br>Défaut de plan de clivage de la division des progéniteurs<br>Arrêt de la migration radiaire                                   | (Bond <i>et al.</i> , 2003)*<br>{Pulvers, 2010<br>#311}<br>(Buchman <i>et al.</i> , 2011)<br>(Fish <i>et al.</i> , 2006) |
| Microcéphalie primaire héréditaire                                        | <i>CDK5RAP2</i> | Protéine associée au centrosome   | Microcéphalie<br>Diminution de la population de progéniteurs<br>Sortie prématurée du cycle cellulaire et mort des progéniteurs | Diminution du nombre de glie radiaire<br>Augmentation des progéniteurs intermédiaires<br>Diminution de la prolifération des progéniteurs<br>Différenciation neuronale prématurée | (Bond <i>et al.</i> , 2005)*<br>(Lizarraga <i>et al.</i> , 2010)<br>(Buchman <i>et al.</i> , 2010)                       |
| Microcéphalie primaire héréditaire                                        | <i>CENPJ</i>    | Protéine associée au centrosome   | Microcéphalie<br>Anomalies du fuseau mitotique<br>Mort cellulaire des progéniteurs                                             | /                                                                                                                                                                                | (Bond <i>et al.</i> , 2005)*<br>{McIntyre, 2012<br>#313}                                                                 |
| Microcéphalie primaire héréditaire                                        | <i>STIL</i>     | Protéine associée au centrosome   | Mort embryonnaire précoce, anomalies du tube neural                                                                            | /                                                                                                                                                                                | (Kumar <i>et al.</i> , 2009)*                                                                                            |
| Microcéphalie primaire héréditaire                                        | <i>CEP152</i>   | Protéine associée au centrosome   | /                                                                                                                              | /                                                                                                                                                                                | (Guernsey <i>et al.</i> , 2010)*                                                                                         |
| Microcéphalie primaire héréditaire                                        | <i>CASC5</i>    | Protéine associée au chromosome   | Mort embryonnaire précoce                                                                                                      | /                                                                                                                                                                                | (Genin <i>et al.</i> , 2012)*                                                                                            |
| Microcéphalie primaire héréditaire<br>Microcéphalie associée à un nanisme | <i>ATR</i>      | Kinase                            | Mort embryonnaire précoce                                                                                                      | /                                                                                                                                                                                | (O'Driscoll <i>et al.</i> , 2003)*<br>(de Klein <i>et al.</i> , 2000)<br>(Brown and Baltimore, 2000)                     |

|                                                                                                                        |                        |                                                    |                                                                                                                                                           |                                                                                                                                     |                                                                                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Microcéphalie isolée ou associée à Pachygyrie/PMG et une hypoplasie cérébelleuse                                       | <i>WDR62</i>           | Protéine associée au centrosome                    | /                                                                                                                                                         | Diminution de la prolifération des progéniteurs                                                                                     | (Bilguvar <i>et al.</i> , 2010)*<br>(Yu <i>et al.</i> , 2010)<br>)*<br>(Bogoyevitch <i>et al.</i> , 2012)                              |
| Lissencéphalie classique (Lis1)                                                                                        |                        |                                                    |                                                                                                                                                           |                                                                                                                                     |                                                                                                                                        |
| Agyrie/pachygyrie/HLSC isolée(s)                                                                                       | <i>PAFAH1B1 (LIS1)</i> | Protéine associée aux microtubules et à la Dynéine | Désorganisation de la plaque corticale<br>Diminution du branchement des interneurons en migration                                                         | Défaut de division des glies radiaires<br>Anomalie de la morphologie des neurones multipolaires<br>Arrêt de la migration radiaire   | (Reiner <i>et al.</i> , 1993)*<br>(Hirotune <i>et al.</i> , 1998)<br>(Gopal <i>et al.</i> , 2010)<br>(Tsai <i>et al.</i> , 2005)       |
|                                                                                                                        | <i>DCX</i>             | Stabilisation des microtubules                     | Défaut de nucléokinese et de branchement des interneurons<br>Couche ectopique de neurones dans l'hippocampe                                               | Arrêt de la migration radiaire                                                                                                      | (des Portes <i>et al.</i> , 1998)*<br>(Gleeson <i>et al.</i> , 1998)*<br>(Koizumi <i>et al.</i> , 2006a)<br>(Bai <i>et al.</i> , 2003) |
|                                                                                                                        | <i>KIF2A</i>           | Dépolymérase des microtubules                      | Dilatation ventriculaire<br>Défaut de lamination du cortex et de l'hippocampe<br>Défaut d'axonogenèse                                                     |                                                                                                                                     | (Poirier <i>et al.</i> , 2013)*<br>(Homma <i>et al.</i> , 2003)<br>(Maor-Nof <i>et al.</i> , 2013)                                     |
|                                                                                                                        | <i>TUBG1</i>           | Protéine du centrosome                             | Mort embryonnaire au stade morula                                                                                                                         | Arrêt de la migration radiaire                                                                                                      | (Poirier <i>et al.</i> , 2013)*<br>(Yuba-Kubo <i>et al.</i> , 2005)                                                                    |
| Agyrie-pachygyrie avec hypoplasie cérébelleuse, du tronc cérébral, anomalies des ganglions de la base et microcéphalie | <i>TUBA1A</i>          | Unité structurelle des Microtubules                | Perturbation des couches II/III et IV du cortex<br>Couche ectopique de neurones dans l'hippocampe                                                         | /                                                                                                                                   | (Keays <i>et al.</i> , 2007)*                                                                                                          |
| Agyrie-pachygyrie et anomalies génitales                                                                               | <i>ARX</i>             | Facteur de transcription                           | Retard de migration tangentielle<br>Perte des interneurons NPY+<br>Réduction des progéniteurs neuronaux<br>Réduction des couches superficielles du cortex | Défaut de prolifération des progéniteurs<br>Anomalie de la morphologie des neurones multipolaires<br>Arrêt de la migration radiaire | (Kitamura <i>et al.</i> , 2002)*<br>(Colasante <i>et al.</i> , 2013)<br>(Friocourt <i>et al.</i> , 2008)                               |
| Agyrie-pachygyrie et hypoplasie cérébelleuse sévère                                                                    | <i>RELN</i>            | Glycoprotéine sécrétée                             | Lamination du cortex inversée                                                                                                                             | /                                                                                                                                   | (Hong <i>et al.</i> , 2000)*<br>(Caviness, 1982)                                                                                       |
|                                                                                                                        | <i>VLDLR</i>           | Récepteur transmembranaire                         | Lamination du cortex inversée                                                                                                                             | /                                                                                                                                   | (Gulsuner <i>et al.</i> , 2011)*<br>(Trommsdorff <i>et al.</i> , 1999)                                                                 |
| Hétérotopie nodulaires péri-ventriculaire                                                                              |                        |                                                    |                                                                                                                                                           |                                                                                                                                     |                                                                                                                                        |

| (HNPV)                                                           |                 |                                                      |                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                           |                                                                                                                                                                   |
|------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HNPV                                                             | <i>FLNA</i>     | Protéine associée à l'actine                         | Microcéphalie<br>Cortex fin<br>Diminution de la population des progéniteurs neuronaux                                                                                             | Altération de la glie radiaire<br>Anomalie de la morphologie des neurones multipolaires<br>Arrêt de la migration radiaire | (Sheen <i>et al.</i> , 2001)*<br>(Feng <i>et al.</i> , 2006)<br>(Nagano <i>et al.</i> , 2004)<br>(Lian <i>et al.</i> , 2012)<br>(Carabalona <i>et al.</i> , 2012) |
| HNPV associée à une microcéphalie et hypoplasie du corps calleux | <i>ARFGEF2</i>  | Trafic vésiculaire                                   | Hétérotopie péri-ventriculaire                                                                                                                                                    | /                                                                                                                         | (Sheen <i>et al.</i> , 2004)*<br>(Zhang <i>et al.</i> , 2012)                                                                                                     |
| Lissencéphalie pavimenteuse (LisII)                              |                 |                                                      |                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                           |                                                                                                                                                                   |
| Syndrome Walker-Warburg/ Syndrome Muscle-eye-brain               | <i>POMT1</i>    | Voie de glycosylation de la matrice extra-cellulaire | Mort embryonnaire précoce<br>Brèches dans la membrane piale                                                                                                                       |                                                                                                                           | (Beltran-Valero de Bernabe <i>et al.</i> , 2002)*<br>(Willer <i>et al.</i> , 2004)                                                                                |
|                                                                  | <i>POMT2</i>    | Voie de glycosylation de la matrice extra-cellulaire | Migration excessive des neurones pyramidaux<br>Brèches dans la membrane piale<br>Anomalies de la migration des neurones cérébelleux<br>Anomalies de la morphologie du gyrus denté |                                                                                                                           | (van Reeuwijk <i>et al.</i> , 2005)*<br>(Hu <i>et al.</i> , 2011)                                                                                                 |
|                                                                  | <i>POMGnT1</i>  | Voie de glycosylation de la matrice extra-cellulaire | Brèches dans la membrane piale<br>Anomalies de la morphologie du gyrus denté                                                                                                      |                                                                                                                           | (Yoshida <i>et al.</i> , 2001)*<br>(Li <i>et al.</i> , 2011)                                                                                                      |
|                                                                  | <i>LARGE</i>    | Voie de glycosylation de la matrice extra-cellulaire | Brèches dans la membrane piale<br>Anomalies de la morphologie du gyrus denté                                                                                                      |                                                                                                                           | (Longman <i>et al.</i> , 2003)*<br>(Li <i>et al.</i> , 2011)                                                                                                      |
|                                                                  | <i>B3GALNT2</i> | Voie de glycosylation de la matrice extra-cellulaire | /                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                           | (Stevens <i>et al.</i> , 2013)**                                                                                                                                  |
|                                                                  | <i>B3GNT1</i>   | Voie de glycosylation de la matrice extra-cellulaire | Brèches dans la membrane piale<br>Défaut de migration neuronale<br>Anomalies du guidage axonal                                                                                    |                                                                                                                           | (Buysse <i>et al.</i> , 2013)<br>(Shaheen <i>et al.</i> , 2013)*<br>(Wright <i>et al.</i> , 2012)                                                                 |
|                                                                  | <i>GTDC2</i>    | Voie de glycosylation de la matrice extra-cellulaire | /                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                           | (Manzini <i>et al.</i> , 2012)*                                                                                                                                   |
|                                                                  | <i>ISPD</i>     | Voie de glycosylation de la matrice extra-cellulaire | Brèches dans la membrane piale<br>Défaut de migration neuronale                                                                                                                   |                                                                                                                           | (Willer <i>et al.</i> , 2012)*<br>(Roscioli <i>et al.</i> , 2012)*<br>(Vuillaumier-Barrot <i>et al.</i> ,                                                         |



|                                                                                                                                   |                |                                                      |                                                                                                                                                     |                                                                                                       |                                                                                                                                      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                   |                |                                                      | Anomalies du guidage axonal                                                                                                                         |                                                                                                       | 2012)*<br>(Wright <i>et al.</i> , 2012)                                                                                              |
|                                                                                                                                   | <i>TMEM5</i>   | Voie de glycosylation de la matrice extra-cellulaire | /                                                                                                                                                   |                                                                                                       | (Vuillaumier-Barrot <i>et al.</i> , 2012)*                                                                                           |
|                                                                                                                                   | <i>LAMB1</i>   | Protéine de la matrice extra-cellulaire              | Mort embryonnaire précoce                                                                                                                           |                                                                                                       | (Radmanesh <i>et al.</i> , 2013)*<br>(Miner <i>et al.</i> , 2004)                                                                    |
| Syndrome Walker-Warburg/ Syndrome Fukuyama                                                                                        | <i>FKTN</i>    | Voie de glycosylation de la matrice extra-cellulaire | Brèches dans la membrane piale<br>Migration excessive des neurones pyramidaux<br>Anomalie de la lamination du cortex de l'hippocampe et du cervelet | /                                                                                                     | (Kondo-lida <i>et al.</i> , 1999)*<br>(Takeda <i>et al.</i> , 2003)                                                                  |
|                                                                                                                                   | <i>FKRP</i>    | Voie de glycosylation de la matrice extra-cellulaire | Dilatation ventriculaire<br>Diminution du nombre de neurones corticaux<br>Défaut d'organisation du cortex, du cervelet et de l'hippocampe           | /                                                                                                     | (Brockington <i>et al.</i> , 2001)*<br>(Chan <i>et al.</i> , 2010)                                                                   |
| Polymicrogyrie (PMG)                                                                                                              |                |                                                      |                                                                                                                                                     |                                                                                                       |                                                                                                                                      |
| PMG bilatérales fronto-pariétales<br>Anomalies cérébelleuses                                                                      | <i>GPR56</i>   | Récepteur transmembranaire                           | Brèches dans la membrane piale<br>Migration excessive des neurones pyramidaux et cérébelleux<br>Anomalie de lamination du cortex et du cervelet     | /                                                                                                     | (Piao <i>et al.</i> , 2004)*<br>(Koirala <i>et al.</i> , 2009; Li <i>et al.</i> , 2008)                                              |
| PMG bilatérales péri-sylvienne                                                                                                    | <i>SRPX2</i>   | Protéine sécrétée                                    | /                                                                                                                                                   | Arrêt de la migration radiaire<br>Défaut d'orientation des processus apicaux neuronaux                | (Roll <i>et al.</i> , 2006)*<br>(Salmi <i>et al.</i> , 2013)                                                                         |
| PMG bilatérales péri-sylvienne/ frontales                                                                                         | <i>DYNC1H1</i> | Transport intra-cellulaire                           | KO : Mort embryonnaire<br>ENU : dégénération des neurones moteurs                                                                                   | Arrêt de la migration radiaire<br>Découplage du noyau et du centrosome des neurones en migration      | (Poirier <i>et al.</i> , 2013)*<br>(Harada <i>et al.</i> , 1998)<br>(Hafezparast <i>et al.</i> , 2003)<br>(Shu <i>et al.</i> , 2004) |
| PMG multi-focales bilatérales<br>Hypoplasie cérébelleuse, du tronc cérébral et anomalie des ganglions de la base<br>Microcéphalie | <i>TUBB2B</i>  | Unité structurelle des Microtubules                  | Diminution de l'épithélium cortical<br>Forte dilatation ventriculaire<br>Diminution des interneurons GAD67+                                         | Arrêt de la migration radiaire                                                                        | (Keays <i>et al.</i> , 2007)*<br>(Stottmann <i>et al.</i> , 2013)<br>(Jaglin <i>et al.</i> , 2009)                                   |
|                                                                                                                                   | <i>TUBB3</i>   | Unité structurelle des Microtubules                  | Anomalies de guidance axonale                                                                                                                       | Défaut de la prolifération des progéniteurs intermédiaires<br>Anomalie de la morphologie des cellules | (Poirier <i>et al.</i> , 2010)*<br>(Tischfield <i>et al.</i> , 2010)                                                                 |

|                           |              |                                    |                                                                                                                                                          |                                                                                                                                      |                                                                                                  |
|---------------------------|--------------|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                           |              |                                    |                                                                                                                                                          | multipolaires<br>Retard de la migration radiaire                                                                                     | Travaux de cette thèse                                                                           |
|                           | <i>TUBB5</i> | Unité structurale des Microtubules | /                                                                                                                                                        | Augmentation de la longueur de la division cellulaire des glies radiaires<br>Accumulation modérée des neurones pyramidaux dans la ZI | (Breuss <i>et al.</i> , 2012)*                                                                   |
| PMG unilatérales/diffuses | <i>PAX6</i>  | Facteur de transcription           | Augmentation des neurones Reelin+ et Calrétinine+<br>Hétérotopie neuronale sous-corticale                                                                | /                                                                                                                                    | (Sisodiya <i>et al.</i> , 2001)*<br>(Stoykova <i>et al.</i> , 2003)<br>(Kroll and O'Leary, 2005) |
| PMG non définies          | <i>TBR2</i>  | Facteur de transcription           | Microcéphalie<br>Diminution des progéniteurs intermédiaires<br>Différentiation perturbée des neurones pyramidaux<br>Neurogenèse abolie dans l'hippocampe | /                                                                                                                                    | (Baala <i>et al.</i> , 2007)*<br>(Arnold <i>et al.</i> , 2008)                                   |
| Schizencéphalie           |              |                                    |                                                                                                                                                          |                                                                                                                                      |                                                                                                  |
| Schizencéphalie           | <i>SHH</i>   | Morphogène                         | Diminution de la taille du cortex<br>Défaut du cycle cellulaire des progéniteurs<br>Apoptose des progéniteurs<br>Défaut de lamination corticale          | /                                                                                                                                    | (Hehr <i>et al.</i> , 2010)*<br>(Komada <i>et al.</i> , 2008)                                    |
| Schizencéphalie           | <i>SIX3</i>  | Facteur de transcription           | Morphologie anormale des commissures cérébrales                                                                                                          | /                                                                                                                                    | (Hehr <i>et al.</i> , 2010)*<br>(Rizzoti <i>et al.</i> , 2004)                                   |

\* référence présentant l'implication du gène dans les MDC

# RESULTATS

## RESULTATS

Mon travail de thèse a consisté dans un premier temps à démontrer l'implication du gène *TUBB3* qui code la sous unité tubuline  $\beta 3$  dans des formes de MDC. Puis dans un deuxième temps, à explorer les mécanismes physiopathologiques de ces malformations dues aux mutations dans *TUBB3* afin de mieux comprendre le rôle de cette tubuline dans le développement du cortex cérébral.

Ces investigations ont été effectuées en explorant les mutants humains identifiés ou en inactivant le gène *TUBB3* par ARNsh. Les expériences entreprises se situent au niveau moléculaire par des expériences de biochimie, au niveau cellulaire en utilisant des lignées cellulaires (Cos7) ou des fibroblastes cutanés de patients présentant une mutation *TUBB3* et enfin *in vivo* grâce à l'approche d'électroporation *in utero* chez la souris.

Au début de ce travail, des investigations de l'équipe ont impliqué deux autres sous-unités tubulines dans des formes de MDC : *TUBA1* et *TUBB2B*. Il semblait alors judicieux de contribuer également à la compréhension de la redondance ou de la spécificité fonctionnelle de ces différentes sous unités.

Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous dans deux articles : le premier publié dans *Human Molecular Genetics* en 2010 et le second accepté pour publication dans le même journal. Les résultats non publiés sont présentés de façon indépendante.

Enfin, deux articles annexes pour lesquelles j'ai participé aux travaux et présentant un nouveau type de MDC associée à une mutation *TUBA1A* et de nouveaux gènes responsables de MDC sont inclus en fin de cette partie « Résultats ».

## Article 1 : Des mutations dans la sous-unité tubuline $\beta$ neuronale TUBB3 résultent en une malformation du développement cortical et des défauts de la migration neuronale.

### Mutations in the neuronal beta tubulin subunit TUBB3 result in malformation of cortical development and neuronal migration defects

*Hum Mol Genet.* 2010 Nov 15;19(22):4462-73.

Poirier K, Saillour Y, Bahi-Buisson N, Jaglin XH, Fallet-Bianco C, Nabbout R, Castelnau-Ptakhine L, Roubertie A, Attie-Bitach T, Desguerre I, Genevieve D, Barnerias C, Keren B, Lebrun N, Boddaert N, Encha-Razavi F & Chelly J.

Des mutations dans le gène *TUBB3*, codant l'isotype 3 de la tubuline  $\beta$ , ont été récemment associées à des syndromes neurologiques variés, qui ont tous en commun des défauts de la motilité oculaire et regroupés sous le terme de Congenital fibrosis of the extraocular muscles type 3 (CFEOM3) (Tischfield *et al.*, 2010). De manière surprenante, et contrairement à ce qui a été précédemment décrit concernant les malformations associées à des mutations dans les gènes *TUBA1A* et *TUBB2B*, aucune anomalie de la migration neuronale n'a été apportée dans cette étude.

Notre étude décrit l'existence de six mutations faux-sens identifiées dans le gène *TUBB3*, chez douze patients, incluant un cas fœtal. Les mutations ont été trouvées à l'état hétérozygote, sauf un cas homozygote, et peuvent être *de novo*, ou transmises selon un mode autosomique dominant. Tous les patients ont en commun des anomalies complexes du développement du cortex, évocatrices de polymicrogyries frontales ou de désorganisations et simplifications gyrales, associées à la combinaison récurrente observée dans les tubulinopathies décrites précédemment : des anomalies du corps calleux et de la capsule interne des ganglions de la base ainsi qu'une hypoplasie du pont et du cervelet. En revanche, nous n'observons aucun signe de CFEOM3 chez ces patients.

Les données d'imagerie ainsi que les analyses neuropathologiques du cas fœtal démontrent que les mutations du gène *TUBB3* pourraient être associées à un spectre très large d'anomalies neuro-anatomiques d'origine développementale, caractérisées par des défauts de la migration et de la différenciation neuronales, ainsi que du guidage axonal.

Des explorations fonctionnelles ont révélé que certaines mutations peuvent être associées à une diminution de la quantité d'hétérodimères produits. Néanmoins, les hétérodimères formés incorporent les microtubules correctement. Nous nous sommes donc intéressés aux propriétés de stabilité du cytosquelette de microtubules dans des cultures primaires de fibroblastes des patients et nous avons pu mettre en évidence une altération de la stabilité

des microtubules en les soumettant à une dépolymérisation forcée par le froid. La modélisation de la structure de la tubuline  $\beta 3$  nous a permis de constater que les résidus mutés et localisés à la surface de la tubuline que nous avons identifiés sont localisés sur la face interne des microtubules, opposée à celle où sont présentes les mutations associées au CFEOM3.

Ces résultats suggèrent donc que les mutations de la tubuline  $\beta 3$  pourraient entraîner des phénotypes différents selon leur localisation, vraisemblablement par une combinaison d'effets modérés sur l'hétérodimérisation et de perturbations des interactions avec des protéines régulatrices, stabilisatrices et/ou déstabilisatrices sur la fonction des microtubules, expliquant ainsi la variabilité phénotypique observée chez les patients.

## Article 2 : Les isoformes de tubulines $\beta$ ne sont pas interchangeables pour restaurer l'altération de la migration radiaire due à l'inactivation de *Tubb3*.

### Beta tubulin isoforms are not interchangeable for rescuing impaired radial migration due to Tubb3 knockdown

*Hum Mol Genet.* 2013 Oct 30

Saillour Y, Bruel-Jungerman E, Broix L, Lebrun N, Rucci J, Poirier K, Francis F & Chelly J

Cette étude, faisant suite à la précédente, s'intéresse à l'effet de la perte d'expression de la tubuline  $\beta 3$  et des mutations responsables de MDC décrites dans le premier article sur les processus de la migration radiaire des neurones pyramidaux corticaux par une approche d'électroporation *in utero* chez la souris.

L'inactivation de *Tubb3* entraîne un défaut de migration drastique au jour embryonnaire E18.5, quatre jours après électroporation de l'ARNsh. La majorité des cellules électroporées est présente dans la zone sub-ventriculaire (ZSV) et la zone intermédiaire du cortex embryonnaire, contrairement aux cellules ayant intégrées le contrôle scramble qui ont migré dans la plaque corticale. Des explorations plus précises au stade E16.5 montrent des anomalies morphologiques significatives de la population des cellules électroporées par l'ARNsh présentes dans la ZSV. On observe ainsi une diminution du nombre de cellules multipolaires présentant des processus multiples bien visibles, à l'inverse, on constate une augmentation du nombre de cellules rondes ne présentant pas ou peu de processus. Ces deux types morphologiques représentent encore 50% des cellules bloquées dans la ZSV à E18.5. Ces résultats laissent donc penser que la diminution de *Tubb3* entraîne des défauts du contrôle des étapes de multipolarisation et re-bipolarisation des neurones pyramidaux lors de la migration radiaire.

Des analyses de l'immuno-marquage au stade E16.5 de la protéine Tbr2, spécifique des progéniteurs neuronaux intermédiaires présents dans la ZSV, révèlent une augmentation de la population de progéniteurs intermédiaires électroporés avec l'ARNsh anti-*Tubb3*. De plus, des études de la prolifération des progéniteurs ne montrent pas de différence de division cellulaire dans la zone ventriculaire mais une diminution importante et significative du nombre de cellules KI67+ ayant incorporé l'ARNsh en comparaison du contrôle dans la zone sub-ventriculaire montrant donc un effet de l'inhibition de *Tubb3* sur la division des progéniteurs intermédiaires. Ces résultats soulèvent de nombreuses questions sur le rôle

potentiel de TUBB3 dans cette population puisque jusqu'à présent la protéine TUBB3 était décrite exclusivement comme étant un marqueur neuronal post-mitotique.

De plus, nous avons pu constater de manière intéressante que le défaut de migration observé est un retard, et non pas un arrêt des neurones en migration puisqu'aux stades post-nataux P2 et P10, alors que l'inhibition de Tubb3 est maintenue, les neurones électroporés rejoignent la plaque corticale.

Enfin, nous avons décidé de prendre avantage de ce modèle de défaut migratoire du à l'absence d'une sous-unité tubuline pour tester la redondance fonctionnelle de la famille des tubulines  $\beta$ . L'arrêt de migration observé peut être sauvé par une surexpression du transcrit humain de TUBB3 alors que les tubulines TUBB1, TUBB2B et TUBB4A sont dans l'incapacité de restaurer pleinement la migration radiaire des neurones sous exprimant Tubb3. Ces observations étayent donc l'hypothèse selon laquelle les sous-unités tubulines possèdent des spécificités fonctionnelles.



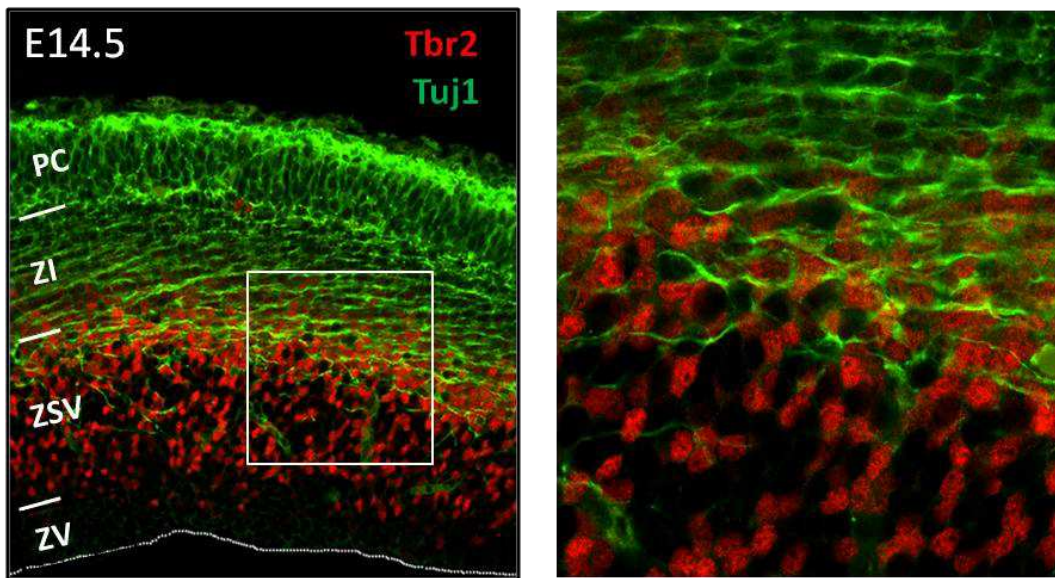
## Données complémentaires de l'article 2

En plus des résultats publiés dans *Human Molecular Genetics*, nous avons complété l'étude de l'impact de l'inhibition de Tubb3 sur la population de progéniteurs intermédiaires.

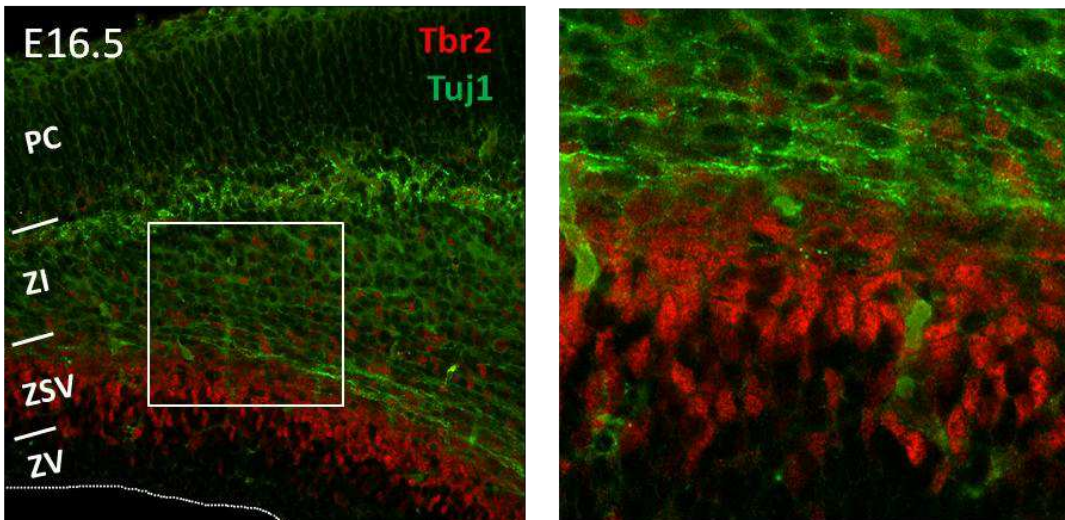
Nous avons ainsi effectué une étude de l'expression de Tubb3 dans les progéniteurs intermédiaires *in vivo* et *ex vivo* par immuno-histochimie et culture mixte de neurones et de progéniteurs intermédiaires (figure 36).

Le profil d'expression cérébral de Tubb3 chez l'embryon murin aux stades E14.5 et E16.5 montrent une absence d'expression dans la ZV (et donc dans les glies radiaires) et un début d'expression dans la ZSV notamment plus forte dans la partie basale de cette zone. Le co-marquage Tuj1/Tbr2 dans cette partie pourrait suggérer une co-expression des ces protéines. Toutefois, de part le fait que Tbr2 soit une protéine nucléaire et Tubb3 une protéine cytoplasmique, il est difficile de conclure définitivement à l'expression de ces deux marqueur dans la même cellule. C'est pourquoi nous avons effectué une culture primaire mixte de cellules neuronales et de progéniteurs intermédiaires à partir de cortex embryonnaire de souris au stade de développement E14.5 fixée deux jours plus tard. Les immuno-marquages de Tubb3 et Tbr2 montrent deux populations cellulaires distinctes exprimant uniquement un des deux marqueurs comme attendu mais aussi une petite population de cellule co-exprimant à la fois Tubb3 et Tbr2. Nous avons pu estimer que ces cellules représentent environ 10% des cellules exprimant Tbr2 (figure 36).

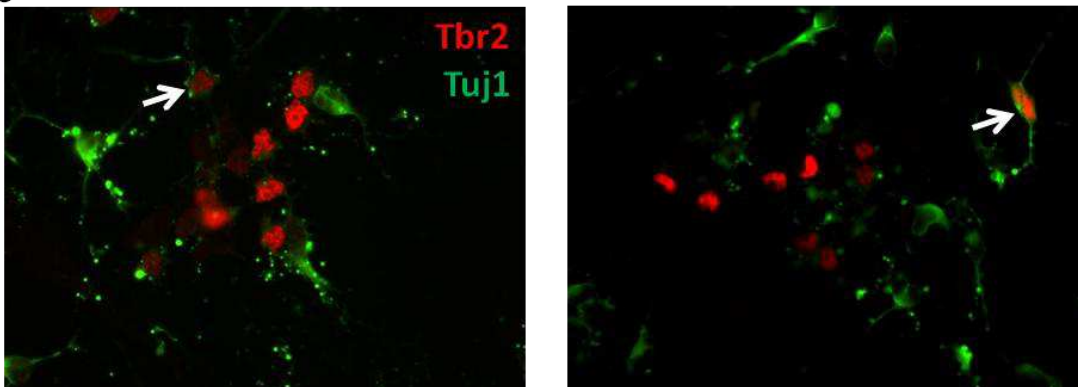
A



B



C



**Figure 36 : Profil d'expression de Tubb3 et Tbr2**

(A-B) Immuno-histochimie d'une coupe coronale embryonnaire de souris aux stades E14.5 et E16.5 avec les anticorps anti Tbr2 et anti-Tubb3 (Tuj1) montrant un chevauchement de leurs aires d'expression dans la ZSV. (C) Marquage par immunocytochimie d'une culture mixte de neurones et de progéniteurs intermédiaires par les anticorps anti-Tbr2 et anti-Tubb3 (Tuj1). Les cellules co-exprimant les deux marqueurs sont indiquées par une flèche.

## Résultats non publiés:

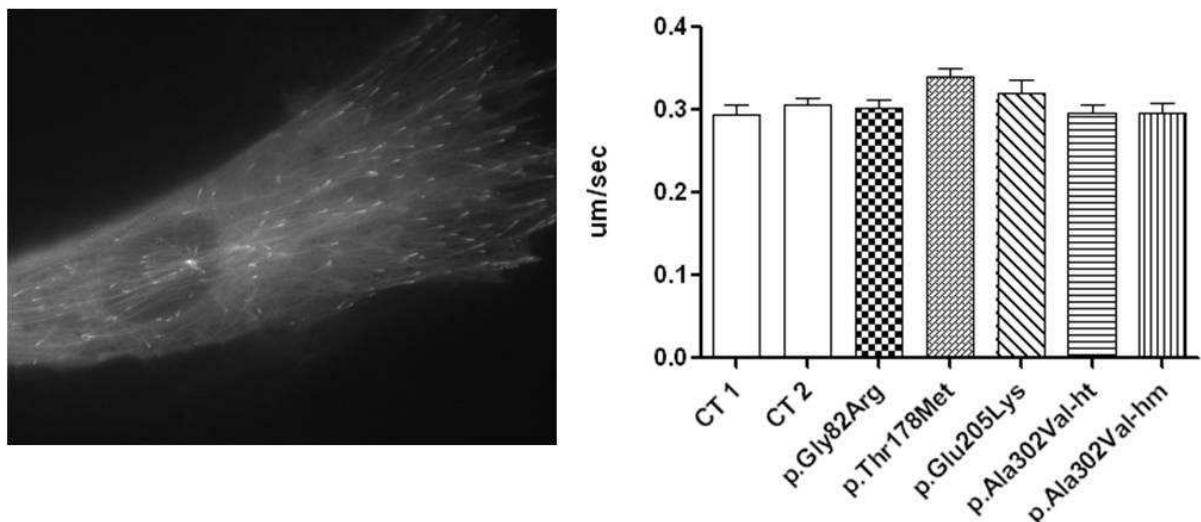
Pour mieux caractériser les défauts entraînés par les mutations de *TUBB3* au niveau cellulaire, nous avons exploré les phénomènes de croissance des extrémités (+) des MT et complété notre étude sur la dépolymérisation des MT soumis à un stress thermique dans les fibroblastes cutanés de patients présentant une mutation *TUBB3*.

Ces expériences ont été entreprises après vérification de l'expression de *TUBB3* au niveau transcriptionnel et traductionnel dans les fibroblastes par RT-PCR quantitative et Western-Blot

### Etude de la croissance des MT dans les fibroblastes de patients porteurs de mutations *TUBB3*.

L'étude de la croissance des MT consiste à analyser la dynamique de croissance des extrémités (+) des microtubules en les traquant en temps réel grâce à la surexpression de la protéine des extrémités (+) EB3 fusionnée à la GFP. Les enregistrements ont été réalisés dans les fibroblastes cutanés de patients présentant les mutations p.Gly82Arg, p.Thr178Met, p.Glu205Lys, p.Ala302Val hétérozygote et homozygote ainsi que dans deux contrôles.

Les résultats n'ont révélé aucune différence entre les vitesses de croissance des MT des fibroblastes contrôle ou mutés (Figure 38).

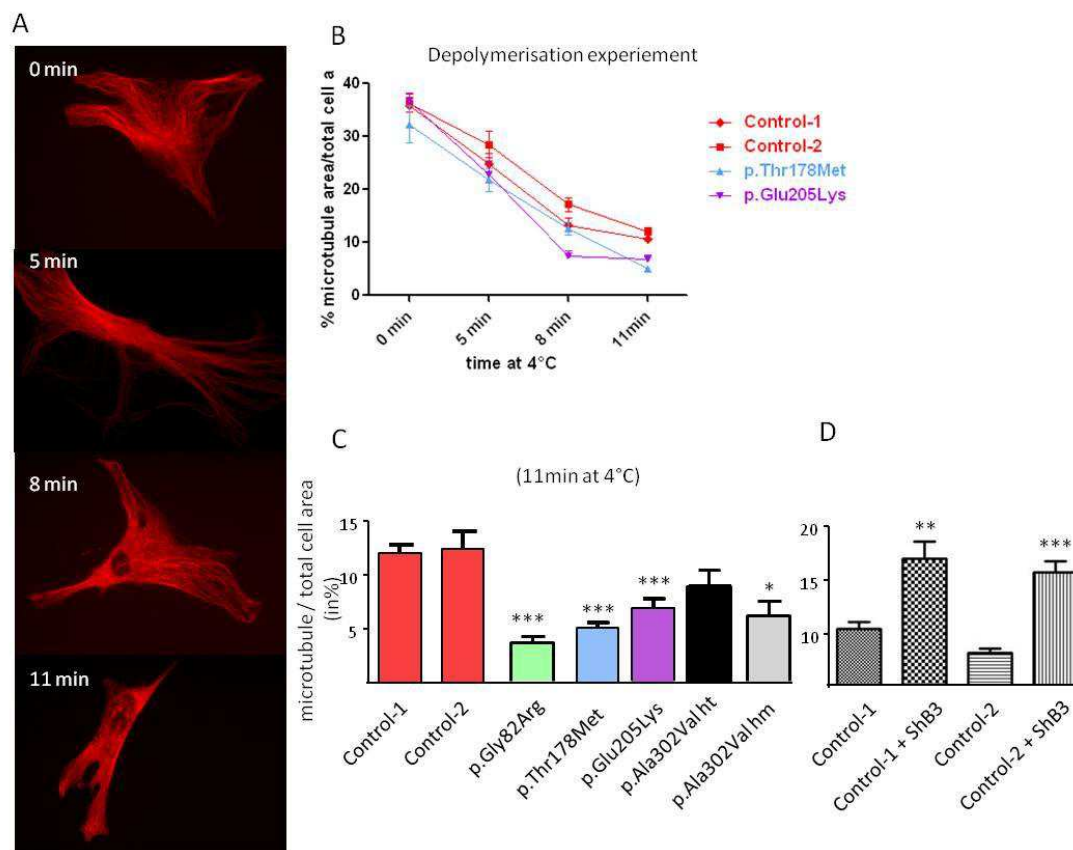


**Figure 37 : Etude de la croissance des MT dans les fibroblastes de patients présentant une mutation de *TUBB3*.**

La surexpression de la protéine EB3 fusionnée à la GFP permet de suivre la croissance des extrémités (+) des MT. L'enregistrement de la vitesse de croissance des MT dans les fibroblastes contrôles et présentant une mutation dans *TUBB3* n'a montré aucune différence (n=10).

## Etude de la dépolymérisation des MT au froid dans les fibroblastes de patients mutés dans *TUBB3*.

Afin d'explorer un défaut éventuel de stabilité des MT dans les fibroblastes de patient présentant une mutation *TUBB3*, nous les avons soumis à une dépolymérisation forcée au froid et suivie par immuno-cytochimie l'aire du réseau de MT à différent temps d'exposition au froid. Nous avons ainsi pu montrer que tous les mutants testés présentent une dépolymérisation accélérée par rapport aux fibroblastes contrôles. Dans un second temps nous avons testé l'effet de l'inhibition de *TUBB3* dans les fibroblastes contrôles et avons observé une résistance des microtubules au froid. Ce phénotype est inverse à celui observé chez les fibroblastes présentant une mutation *TUBB3*, ce qui suggère que ces mutations n'agissent pas comme une haplo-insuffisance (Figure 39).



**Figure 38 : Etude de la dépolymérisation des MT dans les fibroblastes de patients *TUBB3* soumis au froid.**

**(A)** Marquage du réseau de microtubules à différent temps de traitement au froid. **(B)** Le calcul de l'aire relative des microtubules dans la cellule permet de suivre la diminution du réseau de microtubule au cours du temps dans chaque type de fibroblastes. **(C)** Analyse statistique de l'aire relative du réseau de microtubules dans les cellules après 11 minutes au froid. Elle permet de constater une diminution significative chez tous les mutants. **(D)** Etude de l'effet de l'inhibition de *TUBB3* sur les fibroblastes contrôles, noter que le phénotype induit par l'ARNsh est inverse à celui observé chez les fibroblastes mutés pour *TUBB3* (n=20 ; t-test, \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ ).

## Article annexe 1 : Elargissement du spectre des dysgénésies corticales liées à *TUBA1A* aux polymicrogyries.

### Expanding the spectrum of TUBA1A-related cortical dysgenesis to Polymicrogyria.

*Eur J Hum Genet.* 2013 Apr;21(4):381-5.

Poirier K, Saillour Y, Fourniol F, Francis F, Souville I, Valence S, Desguerre I, Marie Lepage J, Boddaert N, Line Jacquemont M, Beldjord C, Chelly J & Bahi-Buisson N.

Les mutations *de novo* du gène *TUBA1A* sont responsables d'un spectre de troubles de la migration neuronale allant de la lissencéphalie à la pachygyrie péri-sylvienne. Récemment une famille présentant une polymicrogyrie (PMG) ainsi qu'une mutation dans *TUBA1A* a été décrite (Jansen *et al.*, 2011).

Par conséquent le but de cette étude est de déterminer la fréquence des mutations de *TUBA1A* dans les patients présentant des PMG et de mieux définir les caractéristiques de ces PMG liées aux mutations dans ce gène. Nous avons criblé un panel de 95 cas sporadiques présentant des PMG bilatérales non-syndromiques incluant 54 PMG péri-sylvienne et 30 PMG associées à d'autres malformations cérébrales. Trois mutations ont été identifiées : dans un cas de PMG bilatérales asymétriques isolées (p.Val235Leu) et deux cas de PMG asymétriques péri-sylviennes associées à des anomalies du pont et du cervelet (p.Tyr161His et p.Arg390Cys). Ces mutations sont donc retrouvées dans 3,1% des PMG totales non expliquées et dans 10% des PMG associées aux anomalies habituellement observées dans les tubulinopathies.

Les mutations sont réparties dans les trois domaines de la structure primaire de la protéine mais leurs localisations dans la structure tertiaire suggèrent un impact de ces mutations sur la dynamique des microtubules, leur stabilité et/ou leurs interactions avec les protéines associées.

Ces données confirment donc l'extension aux PMG du spectre des MDC liées aux mutations du gène *TUBA1A* et insiste d'avantage sur l'importance des anomalies des ganglions de la base, du corps calleux, du pont et du cervelet pour l'orientation du diagnostic moléculaire des PMG.

## Article annexe 2 : Les mutations dans les gènes *TUBG1*, *DYNC1H1*, *KIF5C* et *KIF2A* sont responsables de malformations du développement cortical associées à une microcéphalie.

### **Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly.**

*Nat Genet.* 2013 Aug;45(8):962.

Poirier K, Lebrun N, Broix L, Tian G, Saillour Y, Boscheron C, Parrini E, Valence S, SaintPierre B, Oger M, Lacombe D, Geneviève D, Fontana E, Darra F, Cances C, Barth M, Bonneau D, Bernadina BD, N'guyen S, Gitiaux C, Parent P, des Portes V, Pedespan JM, Legrez V, Castelnau-Ptakine L, Nitschke P, Hieu T, Masson C, Zelenika D, Andrieux A, Francis F, Guerrini R, Cowan NJ, Bahi-Buisson N, Chelly J.

Ces travaux publiés récemment par notre équipe montrent l'implication de nouveaux gènes dans les MDC et présentent des données physiopathologiques pour chacun d'entre eux.

Un projet de séquençage de l'exome de 16 patients présentant des MCD non expliquées (10 lissencéphalie/pachygyrie et 6 PMG) et de leurs parents à la recherche de mutation *de novo* a été entrepris. Une stratégie de gène candidat focalisant sur les gènes codant les protéines du réseau de MT et de protéines associées aux MT a permis de mettre en évidence des mutations faux-sens *de novo* dans des gènes codant les moteurs moléculaires du transport intracellulaire dépendant des microtubules. Ainsi, deux mutations ont été retrouvées dans *DYNC1H1* codant la sous unité lourde du complexe dynéine et une mutation dans *KIF5C* et *KIF2A* codant deux membres de la famille des kinésines. De plus, deux mutations ont été retrouvées dans *TUBG1*, une des deux tubulines  $\gamma$  constituant du centrosome. Le criblage d'une cohorte supplémentaire de 300 patients présentant des MDC a permis d'identifier sept mutations supplémentaires dans *DYNC1H1* et une nouvelle dans *KIF2A* et *TUBG1*.

Les patients présentant une mutation dans ces gènes partagent certains signes phénotypiques communs: une malformation corticale sévère de type lissencéphalie/pachygyrie (13/15) ou PMG frontale (2/15) suivant un gradient de sévérité postérieur>antérieur associée à une microcéphalie (9/15) une épilepsie précoce (14/15) et une dysgénésie du corps calleux (11/15).

Dans un deuxième temps, nous avons exploré les conséquences de ces mutations dans la fonction des différentes protéines. Nous avons ainsi mesuré la capacité des kinésines mutantes et sauvages à hydrolyser l'ATP et avons pu observer une absence complète d'hydrolyse dans le cas de la protéine KIF5C mutante. Ce résultat suggère une incapacité de la protéine mutante à migrer le long des microtubules. Ceci a été confirmé par des

expériences cellulaires dans des cellules COS7 qui ont révélé une localisation de la protéine mutante anormalement enrichie sur les MT.

Parallèlement à ces expériences, les séquences du domaine de liaison aux microtubules de DYNC1H1 sauvage et muté ont été testées pour leur capacité à co-sédimer avec des MT polymérisés par le taxol. Ces expériences ont montré une réduction significative de la capacité des protéines mutantes DYNC1H1 p.Lys3336Asn et p.Arg3384Gln à se lier aux MT.

De plus, l'humanisation de la levure a montré des anomalies mitotiques chez les mutants *TUBG1* consistant en une position incorrecte du noyau et suggérant un défaut de l'organisation du faisceau de microtubules mitotiques. Enfin, l'inactivation *in utero* chez la souris de *Tubg1* entraîne un arrêt de la migration radiaire des neurones pyramidaux corticaux. Ces résultats montrent le rôle de TUBG1 à la fois dans les processus mitotique et migratoire.

Les résultats de ces études renforcent l'importance des protéines du centrosome et de l'interactome des MT dans le développement cortical et suggèrent que les processus mitotiques et post-mitotiques dépendants des MT sont des contributeurs majeurs de la physiopathologie des MDC.

# DISCUSSION



## DISCUSSION

Les progrès technologiques rapides de la biologie moléculaire appliqués à la génétique humaine ces quinze dernières années ont permis d'élucider les causes génétiques d'un grand nombre de malformations du développement du cortex et d'anomalies de la migration neuronale jusqu'alors inexplicables. Ainsi notre laboratoire, après avoir impliqué à la fin des années 1990 le gène *DCX* dans la lissencéphalie classique liée à l'X et les HLSC (des Portes *et al.*, 1998), a contribué ces dernières années à la description de formes de lissencéphalies classiques et de polymicrogyries associées à des mutations dans des gènes codant des tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ , *TUBA1A*, *TUBB2B*, *TUBB3* et *TUBB5* formant ainsi le groupe naissant des tubulinopathies (Breuss *et al.*, 2012; Jaglin *et al.*, 2009; Keays *et al.*, 2007; Poirier *et al.*, 2010). Si l'implication du cytosquelette et des microtubules au cours du développement du système nerveux central est bien connue maintenant, ces apports de la génétique ouvrent de nouvelles voies pour comprendre le rôle des microtubules, les mécanismes qui peuvent en altérer la fonction au cours de la migration et de la différenciation neuronales. Au cours de ce travail de thèse, nous avons tout d'abord participé à l'implication du gène *TUBB3* dans les MDC, puis nous nous sommes intéressés aux impacts moléculaires, cellulaires et développementaux de ces mutations et de la perte de fonction de *TUBB3* ainsi qu'à l'interchangeabilité fonctionnelle des sous unités de tubulines  $\beta$ .

Notre travail a montré l'existence de six mutations faux-sens dans sept familles de MDC différentes. Ces mutations sont principalement observées à l'état hétérozygote et peuvent être *de novo* ou présentes chez un des parents symptomatique. Les patients présentent des PMG ou des désorganisations de la gyration associées aux autres anomalies typiques des tubulinopathies : anomalies du corps calleux et des ganglions de la base associées à des dysgénésies du tronc cérébral et du cervelet.

Nos explorations physiopathologiques ont mis en évidence un défaut d'hétérodimérisation au niveau biochimique de la majorité des mutants mais une incorporation correcte au réseau de MT dans le contexte cellulaire ainsi qu'une instabilité au froid accentuée des MT des fibroblastes des patients.

Nos études sur le développement cortical embryonnaire chez la souris nous ont permis de mettre en évidence l'importance de *Tubb3* dans le processus de migration radiaire, notamment en observant des défauts de la population des progéniteurs intermédiaires et du stade multipolaire de la migration des neurones pyramidaux.

Enfin, ces explorations par électroporation *in utero* ont générés des résultats intéressants sur le caractère transitoire du défaut de la migration radiaire induite par la sous-expression de *Tubb3* ainsi que sur la non-interchangeabilité fonctionnelle des tubulines.

Les implications et les questions que génèrent ces résultats sont discutées dans les paragraphes suivants.

# 1. Implication de *TUBB3* dans des formes de MDC.

## 1.1 Un gène, deux pathologies.

Peu avant l'implication par nos travaux de *TUBB3* dans des formes de MDC présentant une association de dysgénésies corticales (PMG ou désorganisation gyrale) associées à des anomalies du corps calleux, des ganglions de la base, du tronc cérébral et du cervelet, le groupe de E. Engle a mis en évidence des mutations hétérozygotes faux-sens de *TUBB3* chez des patients présentant un syndrome caractérisé par une anomalie d'innervation des muscles oculaires CFEOM3 (Congenital fibrosis of the extraocular muscles type 3) sans anomalie de la migration neuronale apparente (Tischfield *et al.*, 2010). Toutefois, on observe chez ces patients les anomalies des ganglions de la base, du corps calleux, du tronc cérébral et du cervelet, communes à toutes les tubulinopathies. On constate donc en partie des conséquences développementales communes dues aux deux types de mutations et des atteintes oculaires et corticales différentes. Comment peut-on expliquer ces différences ?

On peut tout d'abord observer que les mutations retrouvées dans les deux pathologies sont différentes. Le cas de l'acide aminé alanine 302 est instructif puisque sa substitution par une thréonine entraîne un syndrome CFEOM3 alors que sa substitution par une valine est responsable d'une désorganisation gyrale.

De façon intéressante également, des mutations récurrentes entraînent des phénotypes comparables, ainsi la mutation p.Glu205Lys est à l'origine des deux cas de PMG périsylyviennes observés dans notre cohorte (Poirier *et al.*, 2010) (Figure 40). De même, les 8 patients porteurs de la mutation p.Glu410Lys présentent un phénotype particulier associant un CFEOM au syndrome de Kallmann (anosmie et hypogonadisme) et à une déficience intellectuelle (Chew *et al.*, 2013).

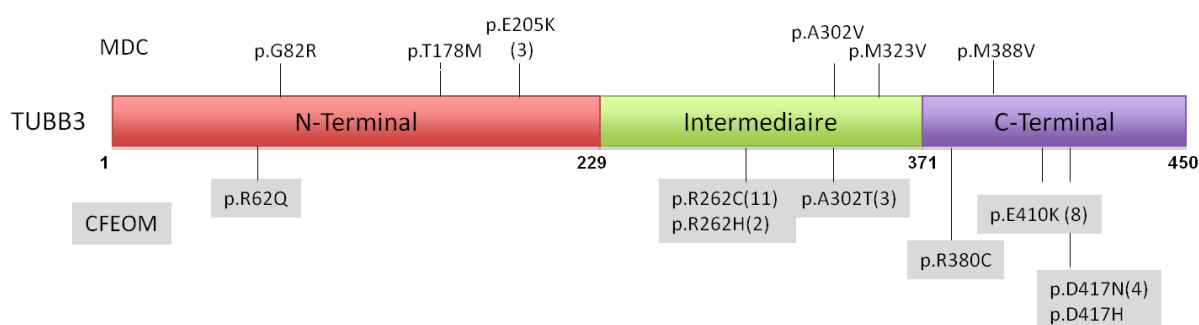
Ces observations suggèrent que l'acide aminé touché par la mutation ainsi que la nature du changement d'acide aminé sont déterminants dans le type de malformations présentées par le patient.

Si l'on s'attache à la localisation des mutations sur la structure primaire de la protéine *TUBB3*, on peut constater que les mutations CFEOM3 et MDC sont réparties sans distinction dans les trois domaines fonctionnels décrits (N-ter, Intermédiaire et C-Ter) (Figure 40-A). Toutefois, la modélisation en trois dimensions de la protéine *TUBB3* permet de constater que les mutations présentes à la surface de la protéine se situent sur la face externe des MT pour les mutations CFEOM3 et sur la face interne pour les mutations MDC. Cette modélisation permet également de prédire les fonctions dans lesquelles les acides aminés sont impliqués principalement. Elles suggèrent ainsi des fonctions différentes des acides aminés mutés, ceux retrouvés dans les cas de CFEOM pouvant jouer un rôle plutôt dans les interactions avec les protéines se liant aux MT alors que celles de la face interne liées aux MCD pourraient être impliquées dans d'autres fonctions telles que la structure et la stabilité des MT (Figure 40-B). Cette hypothèse est confortée par des expériences effectuées chez la

levure qui montrent que cinq mutants CFEOM3 présentent un défaut de liaison aux Kinésines (Tischfield *et al.*, 2010).

Enfin, même si aucun des résidus retrouvés mutés dans les deux pathologies n'est prédit comme étant une cible de modification post traductionnelle, on ne peut pas exclure un effet des mutations sur ce mécanisme.

**A**



**B**

| Mutation    | Formation des Hétérodimères | Incorporation aux MT | Groupe | phénotype             |
|-------------|-----------------------------|----------------------|--------|-----------------------|
| p.Gly82Arg  | Indéetectable               | Normale              | E      | PMG multifocales      |
| p.Thr178Met | Normale                     | Normale              | A      | PMG généralisées      |
| p.Glu205Lys | Indéetectable               | +/-                  | E      | PMG multifocales      |
| p.Ala302Val | Indéetectable               | Normale              | E      | Simplification gyrale |
| p.Met323Val | Diminuée                    | Normale              | B      | Simplification gyrale |
| p.Met388Val | Indéetectable               | +/-                  | E      | Micro-lissencéphalie  |
|             |                             |                      |        |                       |
| p.Arg62Gln  | Indéetectable               | +/-                  | C      | CFEOM                 |
| p.Arg262Cys | Indéetectable               | +/-                  | D      | CFEOM                 |
| p.Arg262His | Diminuée                    | Normale              | D      | CFEOM                 |
| p.Ala302Thr | Indéetectable               | Normale              | E      | CFEOM                 |
| p.Arg380Cys | Indéetectable               | Normale              | D      | CFEOM                 |
| p.Glu410Lys | Diminuée                    | Normale              | D      | CFEOM+Kallmann        |
| p.Asp417Asn | Diminuée                    | Normale              | D      | CFEOM                 |
| p.Asp417His | Diminuée                    | Normale              | D      | CFEOM                 |

**Figure 39 : Répartition et caractéristiques des mutations *TUBB3*.**

**(A)** Répartition des mutations *TUBB3* liées à une MCD ou un CFEOM sur la structure primaire de la protéine. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de patients présentant cette mutation. **(B)** Tableau récapitulant pour chaque mutation les phénotypes biochimiques de formation d'hétérodimères  $\alpha\beta$ , d'incorporation au MT par surexpression cellulaire, le groupe auquel elles appartiennent et le phénotype associé chez l'homme. Les mutations ont été assignées dans 5 groupes suivant les modélisations structurales 3D. Groupe A : poche de liaison au GTP, la liaison au nucléotide est essentielle au repliement de la protéine, la stabilité des hétérodimères et la dynamique des MT, groupe B : Interactions longitudinales, groupe C : interactions latérales, groupe D : interactions avec les MAP et les protéines motrices, groupe E : repliement de la tubuline.

## 1.2 Actualisation du concept de tubulinopathie.

Les premières investigations génétiques mettant en évidence l'implication des sous-unités *TUBA1A* et *TUBB2B* ont permis de définir un phénotype cortical spécifique pour ces deux gènes : ainsi, les mutations dans *TUBA1A* entraînent principalement des lissencéphalies classiques alors que des mutations dans *TUBB2B* sont principalement responsables de PMG asymétriques (Jaglin *et al.*, 2009; Keays *et al.*, 2007). La découverte de nouveaux cas de patients présentant des mutations dans les sous-unités tubulines remettent en cause partiellement la simplicité de cette classification.

Un travail récent au sein du laboratoire de corrélation génotype-phénotype étudiant une cohorte de près de 80 patients présentant une mutation dans une sous-unité tubuline  $\alpha$  ou  $\beta$  a pu confirmer la prépondérance d'un type de MDC pour chaque tubuline mais aussi un chevauchement entre les différents types de tubulinopathies. Ainsi, *TUBA1A* est majoritairement liée au spectre agyrie/pachygyrie à prédominance postérieure, *TUBB2B* à des anomalies de type polymicrogyrique généralisé, *TUBB3* à des malformations plus modérées allant des PMG focales ou multifocales à la simplification gyrale et enfin *TUBB5* est caractérisée par une microcéphalie sévère liée à une MDC légère. En outre, on retrouve également des pachygyries liées à des mutations dans *TUBB2B*, des PMG généralisées liées à *TUBA1A* et *TUBB3* et des PMG focales liées à *TUBA1A* et *TUBB2B*. Dans tous les cas les critères distinctifs des tubulinopathies, c'est à dire la combinaison microcéphalie, anomalies du corps calleux et des tracts cortico-thalamiques et anomalies sus-tentotielles (tronc cérébral et cervelet) restent constants (Bahi-Buisson et coll., en rédaction).

L'implication de *TUBB3* puis de *TUBB2B* dans des cas de CFEOM a encore augmenté le niveau de complexité des phénotypes observés dans les pathologies du SNC liées aux tubulines. Il est intéressant de constater que la mutation p.Glu421Lys de *TUBB2B* décrite par le groupe de E. Engle cause un CFEOM associé à des PMG asymétriques bilatérales (Cederquist *et al.*, 2012). Ce phénotype montre le chevauchement phénotypique et physiopathologique entre les CFEOM et les MDC liés aux mutations dans les tubulines.

Enfin, les données physiopathologiques générées par ce travail de thèse montrant des anomalies de la population des progéniteurs intermédiaires et des neurones en migration dues à l'inactivation de *Tubb3* tendent à confirmer que les PMG peuvent être la conséquence d'une combinaison d'altérations de la prolifération des progéniteurs neuronaux et des étapes précoces de la migration radiaire. Ces observations sont en contradiction apparente avec la classification proposée par Barkovich selon laquelle les PMG liées à *TUBB3* seraient des malformations dues à un développement anormal post-migratoire (Barkovich *et al.*, 2012).

## 2. Mécanisme d'action des mutations *TUBB3*.

Les mutations dans les tubulines étant presque exclusivement des mutations à l'état hétérozygote, on peut donc conclure qu'elles agissent de façon dominante. On admet classiquement que cette dominance peut s'exercer par trois mécanismes d'action : l'haplo-insuffisance, la dominance négative ou le gain de fonction.

Les expériences de biochimie entreprises montrent une incapacité de quatre des cinq mutations de *TUBB3* testées à s'hétérodimériser, ce qui sous-entendrait une perte de fonction de la protéine et donc une expression de la mutation par haplo-insuffisance. Toutefois, la surexpression des mutants dans les cellules Cos7 montre la capacité des mutants à s'incorporer au réseau de MT.

Les tests de dépolymérisation au froid montrent quand à eux une instabilité des MT des fibroblastes mutés supposant donc que les mutations de *TUBB3* entraînent un défaut structural des MT notamment des liaisons latérales  $\beta$ - $\beta$  ou longitudinales  $\alpha$ - $\beta$ , ou encore de liaison aux MAP stabilisatrices. Cette diminution de la stabilité est opposée à celle que nous observons lors de nos expériences de dépolymérisation au froid des fibroblastes soumis à l'ARNsh anti-*TUBB3*, ce qui suggère que l'haplo-insuffisance créée par les mutations est liée à leur incorporation aux MT et ne mime pas l'effet de l'absence de protéine.

Nous avons étayé ces observations par nos expériences de complémentation *in vivo* de sous expression de *Tubb3* par deux mutants (p.Gly82Arg et p.Met388Val). Ces deux mutants sont incapables de restaurer une migration normale des neurones ayant incorporé l'ARNsh contrairement à la sur-expression de la forme sauvage de *TUBB3*. Ces résultats montrent donc que ces formes de *TUBB3* mutées ne sont pas pleinement fonctionnelles.

De plus, nous avons testé l'impact de la surexpression de ces deux mutants (p.Gly82Arg et p.Met388Val) sur la migration radiaire. Nous avons constaté que les mutants n'entraînent pas de défaut de migration majeur mais que la distribution des neurones ayant intégré le mutant p.Met388Val semble plus diffuse suggérant un défaut subtil de l'organisation de ces neurones dans la plaque corticale. Ces observations laissent penser que ces mutations n'ont pas d'effet dominant négatif majeur.

Il est intéressant de noter que les mécanismes d'action des mutations responsables de CFEOM et de MCD semblent différents. En effet, les tests fonctionnels effectués sur les fibroblastes de patients présentant une mutation dans *TUBB3* responsables de MCD ont montré une vitesse de croissance normale des extrémités (+) alors que Tieschfield et coll. montrent à l'inverse dans un modèle de levure que les mutations *TUBB3* donnant un CFEOM3 entraînent une diminution significative de la vitesse de polymérisation des MT. De plus, il a été observé que ces dernières mutations entraînent une augmentation de la stabilité des microtubules comparable au phénotype créé par l'ARN-sh dans les fibroblastes humains et opposée aux observations dans les fibroblastes de patients MCD présentant des mutations *TUBB3* (Tischfield *et al.*, 2010).

Il est également important de rappeler que l'étude récente de l'équipe de N. Hirokawa (décrite p.82-83) montre que deux mutants CFEOM3 (p.Gle410lys et p.Asp417His) agissent par dominance négative et prouve que leur incorporation au MT est nécessaire à l'observation du défaut d'axonogenèse suite à leur surexpression *in utero* chez la souris (Niwa *et al.*, 2013).

En conclusion, les mécanismes physiopathologiques en jeu semblent complexes et différents suivant le type de mutation, le processus et le niveau biologiques observés. Les travaux entrepris aux échelles moléculaire et cellulaire tendant à privilégier un mécanisme d'haplo-insuffisance par perte de fonction. En outre, les expériences *in utero* chez la souris ne montrent pas d'effet dominant négatif majeur. Toutefois, un effet gain de fonction ne peut pas être exclu et il est probable que chaque mutation puisse affecter les différents processus biologiques de façon originale.

### **3. Rôle de TUBB3 dans la migration radiaire :**

L'étude du rôle de Tubb3 dans la migration neuronale radiaire a été appréhendée par une approche *in vivo* qui consiste en sa sous-expression grâce à un ARNsh électroporé *in utero* chez la souris à E14.5 et par l'observation du destin des cellules électroporées dans le cortex à différents stades embryonnaires et péri- ou post-nataux (E16.5, E18.5, P0, P2 et P10).

Nous avons constaté une présence importante de cellules ectopiques électroporées par l'ARNsh dans la ZSV et la ZI alors que les cellules ayant incorporées la construction contrôle ont migré majoritairement dans la plaque corticale. L'exploration de ce phénomène nous a permis de mettre en évidence des défauts dans la population des neurones en migration ainsi que dans celle des progéniteurs intermédiaires. Ces données apportent un nouvel éclairage sur le rôle de la tubuline  $\beta 3$  sur certains processus cellulaires de la migration neuronale radiaire.

#### **3.1 Défauts des neurones pyramidaux en migration**

##### ***3.1.1 Retard de la migration radiaire***

Le retard de migration observé à la suite de l'électroporation *in utero* de l'ARNsh anti-Tubb3 est un phénotype qui a également été mis en évidence par cette même approche chez les rongeurs pour d'autres gènes de MCD tels qu'*Arx*, *Dcx*, *Lis1*, *Flna*, *Tubb2b* ou *Tubb5* (Bai *et al.*, 2003; Breuss *et al.*, 2012; Friocourt *et al.*, 2008; Jaglin *et al.*, 2009; Nagano *et al.*, 2004;

Tsai *et al.*, 2005). Cette observation est en corrélation avec la forte expression de Tubb3 dans les neurones corticaux.

Ce défaut de migration n'est pas un arrêt définitif mais un retard puisque l'on constate aux stades post-nataux que les neurones électroporés ont rejoint la plaque corticale alors que l'expression de Tubb3 en post natal due à l'ARNsh est toujours réprimée. En effet nous avons confirmé par immuno-histochimie la présence dans le cortex de neurones n'exprimant pas ou peu Tubb3 (données non présentées). Ce résultat est original car peu d'études explorent l'évolution temporelle du défaut de migration généré aux stades embryonnaires. Contrairement à nos observations, les électroporations *in utero* des ARNsh anti-SrpX2 et Dcx montrent un arrêt de migration qui persiste après la naissance (Salmi *et al.*, 2013) (Manent *et al.*, 2009).

Comment peut-on expliquer ce phénotype transitoire ?

On peut supposer une prise en charge des fonctions de Tubb3 par d'autres sous-unités tubuline  $\beta$  en postnatal, notamment par des sous-unités exprimées dans le cerveau fœtal et adulte. En se référant au tableau 2 (p.43) on peut estimer que TUBB2A et TUBB4B sont de bons candidats dans l'hypothèse de compensation (Les sous-unités TUBB2B et TUBB4A ayant été incapables de restaurer complètement le phénotype dans nos expériences).

On peut aussi supposer une extinction de l'expression du ou des partenaires de Tubb3 dont la perte d'interaction au stade embryonnaire serait impliqué(s) dans le défaut de migration neuronale mais également l'induction d'un facteur permettant de surpasser l'absence de Tubb3.

### 3.1.2 Anomalies morphologiques des cellules neuronales multipolaires

L'observation attentive des cellules présentes dans la ZAM (Zone d'Accumulation Multipolaire) montre un défaut de la morphologie de ces cellules qui perdent leur morphologie multipolaire au profit d'une morphologie ronde ou présentant peu de processus aux stades E16.5 et E18.5.

On peut mettre ce résultat en corrélation avec ceux observés dans les modèles expérimentaux d'inactivation *in utero* par ARNsh de Dcx, Flna et Lis1. Dans ces trois modèles on observe également des défauts de la phase multipolaire de la migration radiaire. L'inhibition de Dcx, Flna ou de Lis1 entraîne une accumulation de cellules multipolaires bloquées présentant des processus très mobiles (Bai *et al.*, 2003; Nagano *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2005).

Ces résultats montrent l'importance de TUBB3 dans le contrôle de l'élongation des processus des cellules multipolaires et dans la sortie de cette étape multipolaire qui dure de 24 à 36h (Noctor *et al.*, 2004; Tabata and Nakajima, 2003). Cette sortie nécessite une re-bipolarisation du neurone pour reprendre sa migration. Nous avons constaté que cette phase multipolaire est rallongée dans notre modèle puisque nous observons encore des

cellules dans la ZAM quatre jours après électroporation alors que les cellules contrôles ont atteints la PC. Il est envisageable que cette difficulté à sortir de la ZAM entraîne le retard de migration neuronale.

On peut expliquer ce phénomène par une trop grande stabilisation des MT dans les cellules ayant intégré l'ARNsh anti-Tubb3. En effet nous avons pu constater dans les fibroblastes que l'inhibition de TUBB3 entraîne une résistance des MT au froid qui pourrait être due à l'augmentation de la stabilisation des MT. Ces résultats confortent le fait que TUBB3 est considérée comme la plus dynamique des sous-unités tubuline  $\beta$  et qu'elle est retrouvée enrichie dans les MT instables (Falconer *et al.*, 1992). L'absence de Tubb3 entraînerait alors une modification de la composition des MT en tubuline  $\beta$ , favorisant la présence des tubulines  $\beta$  les moins dynamiques.

Les changements morphologiques de la phase multipolaire entraînent l'extension et la rétractation rapide des processus cellulaires suivie d'une bipolarisation. Ces modifications nécessitent une réorganisation rapide du réseau de MT comprenant des séries de catastrophes et de repolymérisations des MT. On peut alors supposer que l'absence de Tubb3 a pour conséquence une baisse de la dynamique des MT et donc des difficultés pour la cellule à entreprendre ces changements morphologiques nécessaires à une migration radiaire correcte.

Il a été montré récemment que Tubb3 interagit avec le récepteur de Netrin-1 DCC (Deleted in Colorectal Cancer) dans des neurones corticaux de souris en culture et que cette interaction est induite par Netrin-1. De plus, cette interaction est dépendante de la dynamique des MT et Netrin-1 module directement cette dynamique via Tubb3. Enfin, les auteurs montrent que l'inhibition de Tubb3 par ARNsh dans des neurones corticaux en culture inhibe la pousse neuritique induite par Netrin-1 (Qu *et al.*, 2013). Ces résultats montrent donc un lien direct entre une molécule de signalisation, le recrutement de la tubuline  $\beta$ 3 à son récepteur et le rôle de cette isoforme dans la réponse biologique à apporter à ce signal. Il est envisageable d'extrapoler ces données dans notre modèle où l'absence de Tubb3 empêche la cellule de répondre correctement à un signal extracellulaire lui intimant d'entreprendre des changements morphologiques drastiques.

Ces résultats confirment donc l'importance des MT et de leurs protéines associées dans le contrôle des changements morphologiques de l'étape multipolaire de la migration radiaire.



## 3.2 Défauts des progéniteurs intermédiaires

L'exploration de la population de progéniteurs intermédiaires nous a permis de mettre en évidence une augmentation d'environ 20% de cellules exprimant le marqueur Tbr2 suite à l'électroporation de l'ARNsh. De plus, l'étude de la division cellulaire nous a révélé une diminution drastique du nombre de cellules entreprenant une division dans la ZSV (mais pas dans la ZV).

Ces observations soulèvent des interrogations, notamment en raison du fait que Tubb3 est considéré comme un marqueur neuronal post-mitotique. Ces phénotypes sont-ils les conséquences de mécanismes intrinsèques ou extrinsèques ? Le profil d'expression de Tubb3 est-il en adéquation avec ces observations ? Tubb3 peut-elle avoir un rôle dans la division cellulaire ? Peut-on imaginer un mécanisme pouvant expliquer ces phénomènes ?

La sous-unité tubuline  $\beta 3$  a été caractérisée comme étant une protéine neuro-spécifique exprimée tôt dans le développement (Menezes and Luskin, 1994). Des études d'analyses de la séquence du promoteur de Tubb3 ont montré la présence de nombreux sites présumés de fixation des facteurs de transcription Nex1/MATH-2 et AP-2 suggérant que l'expression de Tubb3 pourrait être régulée par des facteurs de transcription nécessaires au déterminisme neuronal et à la différenciation morphologique précoce (Dennis *et al.*, 2002).

Le profil d'expression cérébral de Tubb3 chez l'embryon murin montre une absence d'expression dans la ZV (et donc dans les glies radiales) et une expression modérée dans la partie apicale de la ZSV qui se renforce dans la partie basale de cette zone ((Menezes and Luskin, 1994) et données personnelles).

Un co-marquage des marqueurs Tbr2 et Tuj1 sur les coupes de cerveau embryonnaire de souris aux stades E14.5 et E16.5 montre que ces deux protéines sont co-exprimées dans une partie de cette zone mais Tbr2 et Tuj1 étant exprimés dans deux compartiments cellulaires différents il est difficile de conclure définitivement sur leurs expressions par les mêmes cellules. La culture primaire *ex vivo* de progéniteurs intermédiaires murins montre bien que les protéines Tbr2 et Tuj1 définissent deux populations cellulaires distinctes avec une population minoritaire co-exprimant les deux marqueurs pouvant illustrer un chevauchement de l'expression de ces deux marqueurs au cours de la différenciation des progéniteurs intermédiaires en neurones.

Pour réconcilier l'ensemble de ces observations on peut imaginer deux mécanismes pouvant aussi agir en synergie :

- (i) Le profil d'expression chevauchant de Tbr2 et Tuj1 nous permet d'envisager une inhibition de la différenciation et de la migration des cellules générées lors des divisions symétriques neurogéniques des PI qui restent alors plus longtemps dans la ZSV. Ces cellules expriment alors de façon prolongée Tbr2 alors qu'elles s'accumulent dans la ZSV et sont sorties des cycles de division cellulaire. Ce

phénomène pourrait expliquer l'augmentation de la population de progéniteurs intermédiaires et une partie de la diminution de la division cellulaire dans la ZSV.

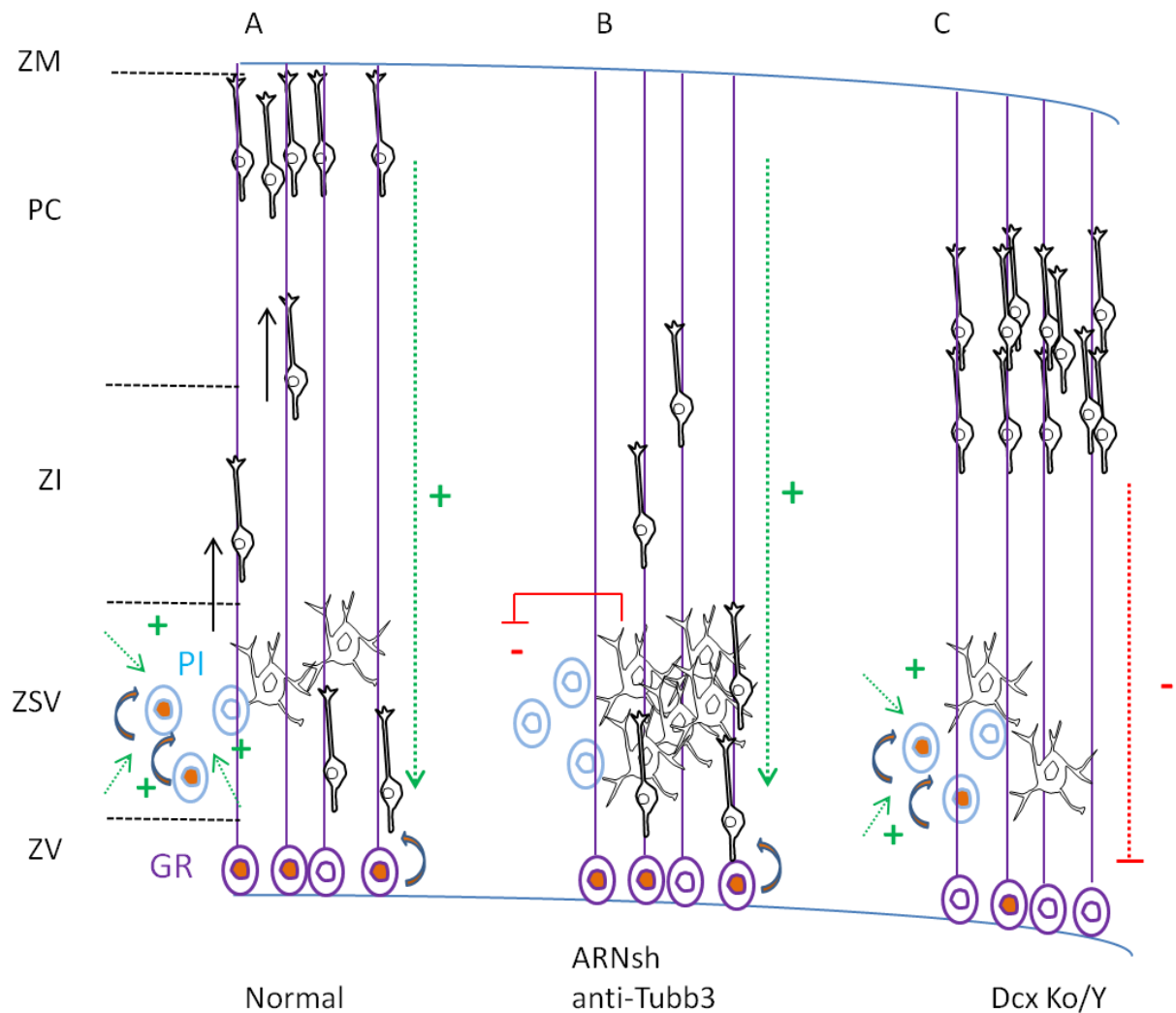
Un deuxième mécanisme indirect permettrait de comprendre la très forte diminution du nombre de cellules en division dans la ZSV :

- (ii) La présence ectopique d'un grand nombre de neurones bloqués dans la ZSV provenant à la fois des glies radiaires et des progéniteurs intermédiaires et qui restent en contact avec les progéniteurs intermédiaires entraîne un signal d'arrêt de leur division cellulaire. Ce mécanisme forme ainsi un phénomène de boucle de contrôle négatif de la prolifération des progéniteurs intermédiaires.

Même si on ne peut pas exclure un rôle direct de Tubb3 sur la division cellulaire des progéniteurs intermédiaires les données actuelles sur sa fonction n'y sont pas en faveur.

Il est intéressant de noter qu'une étude du modèle d'inactivation constitutive de *Dcx*, autre marqueur neuronal ayant un profil d'expression comparable à Tubb3, a montré des anomalies de positionnement des neurones dans la plaque corticale associées à des défauts de l'orientation du fuseau mitotique des glies radiaires et leur sortie prématurée du cycle cellulaire. A l'inverse de notre modèle, on ne constate aucune anomalie des progéniteurs intermédiaires. Ces défauts d'organisation corticale et de division des progéniteurs sont exacerbés dans le modèle double KO hétérozygote (*Dcx* ko/Y, *Lis1* ko/+) (Pramparo *et al.*, 2010). Les auteurs expliquent ce phénotype en partie par l'existence d'une petite sous-population de cellules exprimant *Dcx* à bas niveau et étant capable de proliférer de façon multipotente (Walker *et al.*, 2007) mais n'envisagent pas de phénomène indirect.

En prenant en compte ces données nous pouvons émettre l'hypothèse d'une contribution de la migration neuronale à la régulation de la prolifération des progéniteurs. La prolifération des progéniteurs intermédiaires serait sensible au nombre de neurones présents dans la ZSV. De même, on peut aussi proposer l'hypothèse que la division des glies radiaires obéirait aux signaux de positionnement neuronal provenant de la plaque corticale (mais pas de la ZSV), vraisemblablement grâce à une signalisation propagée le long de leurs processus basaux qui traversent tout le mur cortical de la ZM à la ZV. Ce nouveau concept (dont la validation nécessite des travaux supplémentaires) qui propose que la prolifération des progéniteurs dans la ZV et la ZSV est régulée par le nombre et le positionnement des neurones dans la ZSV, la ZI et la PC est illustré dans la Figure 41.



**Figure 370 : Schéma de l'hypothèse de participation du positionnement neuronal à la prolifération des progéniteurs neuronaux.**

(A) Dans la condition normale les glias radiales (GR) et les progéniteurs intermédiaires (PI) prolifèrent (noyaux et flèches oranges) dans la zone ventriculaires (ZV) et la zone sub-ventriculaire (ZSV) respectivement. Les neurones générés migrent à travers la ZSV, où ils entreprennent l'étape multipolaire, la zone intermédiaire (ZI) et la plaque corticale (PC). La prolifération est contrôlée par le positionnement des neurones dans la ZSV pour les PI et dans la PC pour le GR via leur processus apicaux.

(B) Avec l'inhibition de Tubb3 par ARNsh l'accumulation de neurones dans la ZSV entraîne un signal négatif sur la division des PI.

(C) Dans le modèle Ko de Dcx le défaut de lamination de la PC entraîne une diminution de la division des GR, potentiellement par leur processus basaux, alors que les PI prolifèrent normalement.

## 4. Apport des approches génétiques à l'hypothèse « multi-tubuline »

Depuis la mise en évidence de la famille des sous-unités tubulines dans les années 1980, il a été proposé que ces gènes codent différents isotypes doués de propriétés spécifiques malgré leur fort taux d'homologie, cette notion est nommée « hypothèse multi-tubulines ». Ce sujet est débattu depuis la mise en évidence d'un nombre croissant de tubulines, certaines données plaident pour une redondance de ces isoformes, d'autres étayant une spécificité intrinsèque des membres de cette famille de protéines.

Les travaux de cette thèse ont apporté de nouvelles données sur la redondance ou la spécificité fonctionnelle des sous-unités des tubulines.

Tout d'abord, les études génétiques des dernières années ont permis l'identification de mutations dans différentes sous unités tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ . La découverte même du lien entre une mutation dans un gène de tubuline et l'apparition d'une anomalie du développement plaide en faveur d'une non-interchangeabilité de la tubuline mutée. De plus, l'absence de détection de mutations STOP ou de délétions laisse penser que ces anomalies sont létales et que ces sous-unités sont indispensables au développement embryonnaire.

Les mutations des gènes *TUBB2B*; *TUBB3* et *TUBB5* sont liées majoritairement à des PMG associées à des anomalies de l'axonogenèse et des malformations ponto-cérébelleuse. Toutefois, des spécificités sont retrouvées dans les trois types de tubulinopathies, *TUBB2B* est associé principalement à des PMG généralisées, *TUBB3* à des simplifications gyrales et *TUBB5* à une microcéphalie importante. Ces différences observées peuvent être également le reflet d'une spécificité fonctionnelle.

Ensuite, les expériences de sauvetage du phénotype dû à la sous-expression de *Tubb3* par d'autres sous-unités confortent l'hypothèse de spécificité fonctionnelle des tubulines par l'incapacité de *TUBB1*, *TUBB2B* et *TUBB4A* de compenser l'absence de *Tubb3*.

Ces résultats sont en adéquation avec des études d'invalidation spécifique de tubulines  $\beta$  dans des cultures de neuroblastomes humains différenciés qui présentent des phénotypes différents (Guo, 2010) ainsi qu'avec une étude effectuée chez la drosophile qui ont montré l'incapacité de remplacer l'absence d'une bêta-tubuline par la surexpression d'une autre sous-unité (Hoyle, 1990). Par ailleurs, nos résultats peuvent paraître en désaccord avec une étude récente de surexpression des mutants des tubulines  $\beta$  décrits par notre équipe et celle de E. Engle montrant que les phénotypes observés de défaut de transport axonal dans les neurones ne seraient pas spécifiques de la tubuline mutée mais de l'acide aminé touché (Niwa, 2013).

Ces différences peuvent être expliquées par le fait que cette notion de spécificité des isoformes peut être relative au processus biologique observé, les tubulines pouvant prendre en charge des fonctions plus ou moins spécifiques suivant le temps, l'espace et la fonction qu'elles exercent.

## 5. Extension des MDC relatives aux MT : vers un mécanisme physiopathologique unique

La mise en évidence récente de mutations dans les gènes *KIF2A*, *KIF5C*, *DYNC1H1* et *TUBG1* marque une nouvelle étape dans l'implication des MT et de leurs protéines associées dans la physiopathologie des anomalies de la migration neuronale chez l'homme.

En effet, après l'identification des unités tubulines (*TUBA1A*, *TUBB2B*, *TUBB3* et *TUBB5*) et de leurs protéines stabilisatrices (*DCX*, *LIS1*), ce sont les protéines motrices (Kinésines et Dynéine) du transport dépendant des MT et du centrosome (Tubuline  $\gamma$ 1) qui sont directement associées dans la physiopathologie des MDC.

On peut ainsi regrouper un grand nombre de protéines impliquées dans les troubles de la gyration autour d'un mécanisme physiopathologiques comprenant le fuseau mitotique des cellules progénitrices en division et surtout le transport intracellulaire dépendant des MT nécessaire aux changements morphologiques du neurone post-mitotique multipolaire, en migration et en différenciation. En effet, la dynamique des MT, le transport des organelles, la polarisation du trafic intracellulaire et l'apport de membranes plasmiques sont des éléments critiques pour les changements morphologiques drastiques entrepris par le neurone lors de ces étapes (figure 42).

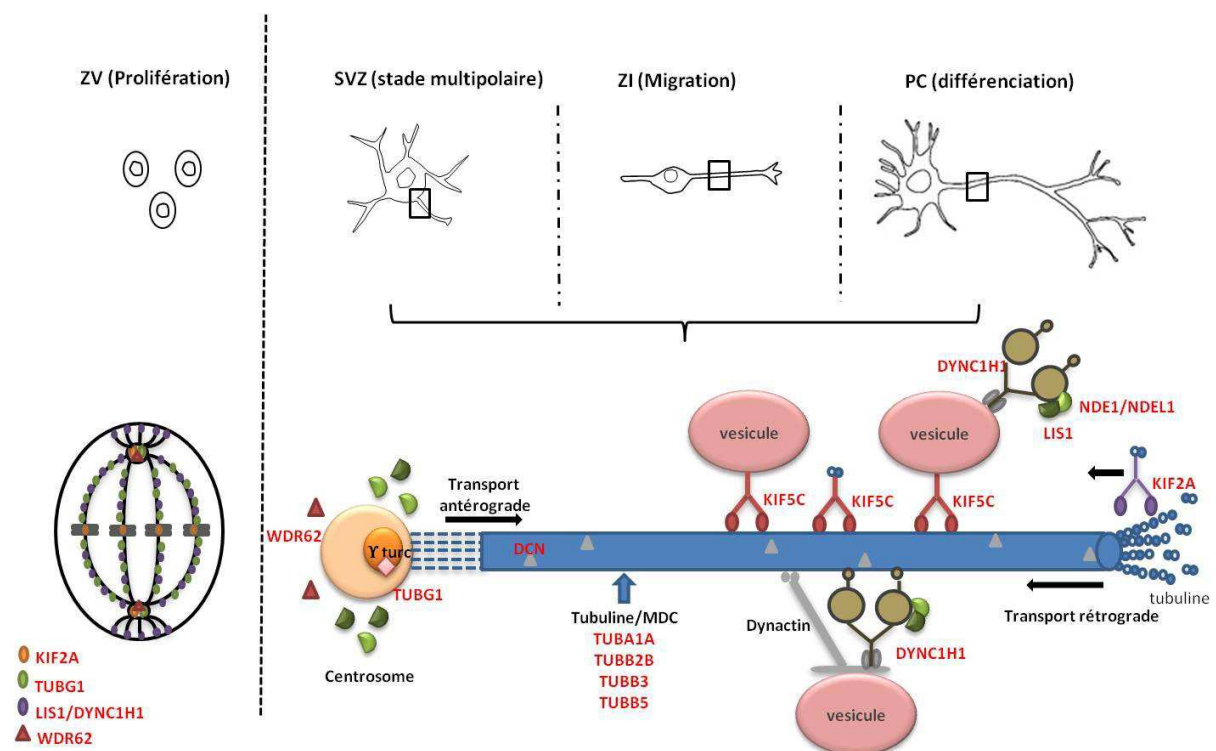


Figure 41 : Mitose et transport intracellulaire dépendant des MT et protéines liées aux anomalies de la gyration.

## 6. Perspectives de l'exploration du rôle de TUBB3 dans le développement cortical

Afin de mieux comprendre le rôle de Tubb3 sur les processus du développement cortical il est nécessaire d'entreprendre des explorations complémentaires.

Tout d'abord il est nécessaire de mieux caractériser la population de progéniteurs intermédiaires exprimant Tbr2 et Tubb3. La co-expression observée de Tubb3 et Tbr2 est elle restreinte à une sous-population de progéniteurs intermédiaires ou est-ce une étape entreprise par tous les progéniteurs intermédiaires en cours de différenciation ? L'expression de deux protéines fluorescentes différentes sous contrôle des promoteurs spécifiques de Tubb3 et Tbr2 permettrait de suivre précisément par imagerie en temps réel le chevauchement de ces deux marqueurs dans une culture de progéniteurs intermédiaires.

Il paraît également judicieux à ce stade de l'étude d'entreprendre des expériences d'électroporation d'un ARNsh anti-Tubb3 conditionnel dont l'expression serait neuro-spécifique ou restreinte aux progéniteurs intermédiaires pour pouvoir disséquer l'apport de chacune des deux populations dans l'apparition du défaut de migration. L'expression des ARNsh anti-Tubb3 et anti-Dcx de façon neuro-spécifique permettraient en outre d'explorer l'hypothèse d'un contrôle indirect de la division cellulaire des progéniteurs par l'anomalie de positionnement des neurones pyramidaux.

Si les résultats obtenus confirment cette hypothèse, ils permettraient de compléter le concept d'homéostasie entre la prolifération et la migration neuronale et participeraient à une meilleure compréhension du développement cortical.

De plus, il semble nécessaire d'investiguer l'impact de l'inhibition de Tubb3 sur la migration tangentielle. En effet, les explorations histo-pathologiques du cerveau du cas fœtal présentant une mutation *TUBB3* p.Met388Val ont montré des éminences ganglionnaires très volumineuses ainsi qu'une diminution du nombre d'interneurones exprimant la Calbindine ou la Calretinine dans le cortex. Ces observations suggèrent des défauts de prolifération ou de différenciation des progéniteurs des interneurones ou encore de la migration tangentielle des interneurones.

Une étude plus poussée de la croissance axonale et du guidage axonal est nécessaire. En effet, on peut observer chez les patients des défauts de l'axonogenèse (hypoplasie du corps calleux et réseau des axones cortico-thalamiques désorganisé) et le modèle murin KI p.Arg262Cys/p.Arg262Cys montre également des défauts de la commissure antérieure et la présence de bandelettes de Probst (Tieschfield, 2010). Il faut ajouter à ces observations que la surexpression *in utero* chez la souris de deux mutants TUBB3 responsables de CFEOM3 entraîne une incapacité des axones calleux à traverser la ligne médiane. Nous n'avons pas pu observer de phénotype similaire dans notre modèle d'ARNsh *in utero* ou de surexpression de mutants responsable de MDC chez l'homme. Toutefois un modèle constitutif KI d'une

mutation *TUBB3* responsable de MDC serait un bon outil pour étudier le guidage axonal cortico-thalamique.

Enfin, les phénomènes altérés aux stades post-mitotiques (phases multipolaire-bipolarisation, migration neuronale et axonogenèse) dans les différents modèles utilisés par notre équipe et d'autres que nous avons présentés précédemment sont intimement dépendant du transport intracellulaire lié aux MT. Ce processus semble donc être une cible de choix des prochaines investigations des mécanismes physiopathologiques sous-tendant les MDC dues aux mutations dans *TUBB3* mais également toutes les tubulinopathies et les pathologies de malformations cérébrales dues à des mutations dans les gènes codant les protéines associées directement ou indirectement aux MT.

# Bibliographie



## BIBLIOGRAPHIE

- Anderson SA, Marin O, Horn C, Jennings K, Rubenstein JL (2001) Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128: 353-363.
- Andrieux A, Salin PA, Vernet M, Kujala P, Baratier J, Gory-Faure S, Bosc C, Pointu H, Proietto D, Schweitzer A, Denarier E, Klumperman J, Job D (2002) The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev* 16: 2350-2364.
- Angevine JB, Jr., Sidman RL (1961) Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192: 766-768.
- Arai Y, Pulvers JN, Haffner C, Schilling B, Nusslein I, Calegari F, Huttner WB (2011) Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat Commun* 2: 154.
- Arlotta P, Molyneaux BJ, Chen J, Inoue J, Kominami R, Macklis JD (2005) Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* 45: 207-221.
- Arnold SJ, Huang GJ, Cheung AF, Era T, Nishikawa S, Bikoff EK, Molnar Z, Robertson EJ, Groszer M (2008) The T-box transcription factor Eomes/Tbr2 regulates neurogenesis in the cortical subventricular zone. *Genes Dev* 22: 2479-2484.
- Audebert S, Desbruyeres E, Gruszczynski C, Koulakoff A, Gros F, Denoulet P, Edde B (1993) Reversible polyglutamylation of alpha- and beta-tubulin and microtubule dynamics in mouse brain neurons. *Mol Biol Cell* 4: 615-626.
- Baala L, Briault S, Etchevers HC, Laumonnier F, Natiq A, Amiel J, Boddaert N, Picard C, Sbiti A, Asermouh A, Attie-Bitach T, Encha-Razavi F, Munnich A, Sefiani A, Lyonnet S (2007) Homozygous silencing of T-box transcription factor EOMES leads to microcephaly with polymicrogyria and corpus callosum agenesis. *Nat Genet* 39: 454-456.
- Baas PW, Deitch JS, Black MM, Banker GA (1988) Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 8335-8339.
- Bahi-Buisson N, Boddaert N, Saillour Y, Souville I, Poirier K, Leger PL, Castelnau L, Plouin P, Carion N, Beldjord C, Chelly J (2008a) [Epileptogenic brain malformations: radiological and clinical presentation and indications for genetic testing]. *Rev Neurol (Paris)* 164: 995-1009.
- Bahi-Buisson N, Poirier K, Boddaert N, Fallet-Bianco C, Specchio N, Bertini E, Caglayan O, Lascelles K, Elie C, Rambaud J, Baulac M, An I, Dias P, des Portes V, Moutard ML, Soufflet C, El Maleh M, Beldjord C, Villard L, Chelly J (2010) GPR56-related bilateral frontoparietal polymicrogyria: further evidence for an overlap with the cobblestone complex. *Brain* 133: 3194-3209.
- Bahi-Buisson N, Poirier K, Boddaert N, Saillour Y, Castelnau L, Philip N, Buyse G, Villard L, Joriot S, Marret S, Bourgeois M, Van Esch H, Lagae L, Amiel J, Hertz-Pannier L, Roubertie A, Rivier F, Pinard JM, Beldjord C, Chelly J (2008b) Refinement of cortical dysgeneses spectrum associated with TUBA1A mutations. *J Med Genet* 45: 647-653.
- Bahi-Buisson N, Souville I, Fourniol FJ, Toussaint A, Moores CA, Houdusse A, Lemaitre JY, Poirier K, Khalaf-Nazzal R, Hully M, Leger PL, Elie C, Boddaert N, Beldjord C, Chelly J, Francis F (2013) New insights into genotype-phenotype correlations for the doublecortin-related lissencephaly spectrum. *Brain* 136: 223-244.
- Bai J, Ramos RL, Ackman JB, Thomas AM, Lee RV, LoTurco JJ (2003) RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat Neurosci* 6: 1277-1283.
- Bamburg JR, Bray D, Chapman K (1986) Assembly of microtubules at the tip of growing axons. *Nature* 321: 788-790.
- Barkovich AJ, Guerrini R, Kuzniecky RI, Jackson GD, Dobyns WB (2012) A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain* 135: 1348-1369.
- Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB (2005) A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurology* 65: 1873-1887.
- Barnes AP, Lilley BN, Pan YA, Plummer LJ, Powell AW, Raines AN, Sanes JR, Polleux F (2007) LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons. *Cell* 129: 549-563.

- Barra HS, Arce CA, Rodriguez JA, Caputto R (1974) Some common properties of the protein that incorporates tyrosine as a single unit and the microtubule proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 60: 1384-1390.
- Barra HS, Rodriguez JA, Arce CA, Caputto R (1973) A soluble preparation from rat brain that incorporates into its own proteins ( <sup>14</sup> C)arginine by a ribonuclease-sensitive system and ( <sup>14</sup> C)tyrosine by a ribonuclease-insensitive system. *J Neurochem* 20: 97-108.
- Bellion A, Baudoin JP, 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.
- Beltran-Valero de Bernabe D, Currier S, Steinbrecher A, Celli J, van Beusekom E, van der Zwaag B, Kayserili H, Merlini L, Chitayat D, Dobyns WB, Cormand B, Lehesjoki AE, Cruces J, Voit T, Walsh CA, van Bokhoven H, Brunner HG (2002) Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet* 71: 1033-1043.
- Bielas SL, Serneo FF, Chechlacz M, Deerinck TJ, Perkins GA, Allen PB, Ellisman MH, Gleeson JG (2007) Spinophilin facilitates dephosphorylation of doublecortin by PP1 to mediate microtubule bundling at the axonal wrist. *Cell* 129: 579-591.
- Bielle F, Griveau A, Narboux-Neme N, Vigneau S, Sigrist M, Arber S, Wassef M, Pierani A (2005) Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat Neurosci* 8: 1002-1012.
- Bilguvar K, Ozturk AK, Louvi A, Kwan KY, Choi M, Tatli B, Yalnizoglu D, Tuysuz B, Caglayan AO, Gokben S, Kaymakcalan H, Barak T, Bakircioglu M, Yasuno K, Ho W, Sanders S, Zhu Y, Yilmaz S, Dincer A, Johnson MH, Bronen RA, Kocer N, Per H, Mane S, Pamir MN, Yalcinkaya C, Kumandas S, Topcu M, Ozmen M, Sestan N, Lifton RP, State MW, Gunel M (2010) Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations. *Nature* 467: 207-210.
- Binder LI, Frankfurter A, Kim H, Caceres A, Payne MR, Rebhun LI (1984) Heterogeneity of microtubule-associated protein 2 during rat brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 5613-5617.
- Bogoyevitch MA, Yeap YY, Qu Z, Ngoei KR, Yip YY, Zhao TT, Heng JI, Ng DC (2012) WD40-repeat protein 62 is a JNK-phosphorylated spindle pole protein required for spindle maintenance and timely mitotic progression. *J Cell Sci* 125: 5096-5109.
- Bond J, Roberts E, Springell K, Lizarraga SB, Scott S, Higgins J, Hampshire DJ, Morrison EE, Leal GF, Silva EO, Costa SM, Baralle D, Raponi M, Karbani G, Rashid Y, Jafri H, Bennett C, Corry P, Walsh CA, Woods CG (2005) A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. *Nat Genet* 37: 353-355.
- Bond J, Scott S, Hampshire DJ, Springell K, Corry P, Abramowicz MJ, Mochida GH, Hennekam RC, Maher ER, Fryns JP, Alswaid A, Jafri H, Rashid Y, Mubaidin A, Walsh CA, Roberts E, Woods CG (2003) Protein-truncating mutations in ASPM cause variable reduction in brain size. *Am J Hum Genet* 73: 1170-1177.
- Bonnet C, Boucher D, Lazereg S, Pedrotti B, Islam K, Denoulet P, Larcher JC (2001) Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation. *J Biol Chem* 276: 12839-12848.
- Book KJ, Howard R, Morest DK (1991) Direct observation in vitro of how neuroblasts migrate: medulla and cochleovestibular ganglion of the chick embryo. *Exp Neurol* 111: 228-243.
- Bosc C, Cronk JD, Pirollet F, Watterson DM, Haiech J, Job D, Margolis RL (1996) Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2125-2130.
- Bouquet C, Soares S, von Boxberg Y, Ravaille-Veron M, Propst F, 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.
- Breuss M, Heng JI, Poirier K, Tian G, Jaglin XH, Qu Z, Braun A, Gstrein T, Ngo L, Haas M, Bahi-Buisson N, Moutard ML, Passemard S, Verloes A, Gressens P, Xie Y, Robson KJ, Rani DS, Thangaraj K, Clausen T, Chelly J, Cowan NJ, Keays DA (2012) Mutations in the beta-tubulin gene TUBB5 cause microcephaly with structural brain abnormalities. *Cell Rep* 2: 1554-1562.
- Brittis PA, Meiri K, Dent E, Silver J (1995) The earliest patterns of neuronal differentiation and migration in the mammalian central nervous system. *Exp Neurol* 134: 1-12.
- Brockington M, Blake DJ, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, Ponting CP, Estournet B, Romero NB, Mercuri E, Voit T, Sewry CA, Guicheney P, Muntoni F (2001) Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet* 69: 1198-1209.
- Brown EJ, Baltimore D (2000) ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev* 14: 397-402.

- Buchman JJ, Durak O, Tsai LH (2011) ASPM regulates Wnt signaling pathway activity in the developing brain. *Genes Dev* 25: 1909-1914.
- Buchman JJ, Tseng HC, Zhou Y, Frank CL, Xie Z, Tsai LH (2010) Cdk5rap2 interacts with pericentrin to maintain the neural progenitor pool in the developing neocortex. *Neuron* 66: 386-402.
- Buck KB, Zheng JQ (2002) Growth cone turning induced by direct local modification of microtubule dynamics. *J Neurosci* 22: 9358-9367.
- Bush MS, Goold RG, Moya F, Gordon-Weeks PR (1996) An analysis of an axonal gradient of phosphorylated MAP 1B in cultured rat sensory neurons. *Eur J Neurosci* 8: 235-248.
- Buyse K, Riemersma M, Powell G, van Reeuwijk J, Chitayat D, Roscioli T, Kamsteeg EJ, van den Elzen C, van Beusekom E, Blaser S, Babul-Hirji R, Halliday W, Wright GJ, Stemple DL, Lin YY, Lefeber DJ, van Bokhoven H (2013) Missense mutations in beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 1 (B3GNT1) cause Walker-Warburg syndrome. *Hum Mol Genet* 22: 1746-1754.
- Bystron I, Blakemore C, Rakic P (2008) Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci* 9: 110-122.
- Caceres A, Kosik KS (1990) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343: 461-463.
- Caceres A, Mautino J, Kosik KS (1992) Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron* 9: 607-618.
- Caceres A, Potrebic S, Kosik KS (1991) The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *J Neurosci* 11: 1515-1523.
- Calegari F, Huttner WB (2003) An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J Cell Sci* 116: 4947-4955.
- Callaway EM (1998) Local circuits in primary visual cortex of the macaque monkey. *Annu Rev Neurosci* 21: 47-74.
- Carabalona A, Beguin S, Pallesi-Pocachard E, Buhler E, Pellegrino C, Arnaud K, Hubert P, Oualha M, Siffroi JP, Khantane S, Couprie I, Goizet C, Gelot AB, Represa A, Cardoso C (2012) A glial origin for periventricular nodular heterotopia caused by impaired expression of Filamin-A. *Hum Mol Genet* 21: 1004-1017.
- Caviness VS, Jr. (1982) Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Brain Res* 256: 293-302.
- Cederquist GY, Luchniak A, Tischfield MA, Peeva M, Song Y, Menezes MP, Chan WM, Andrews C, Chew S, Jamieson RV, Gomes L, Flaherty M, Grant PE, Gupta ML, Jr., Engle EC (2012) An inherited TUBB2B mutation alters a kinesin-binding site and causes polymicrogyria, CFEOM and axon dysinnervation. *Hum Mol Genet* 21: 5484-5499.
- Chan YM, Keramaris-Vrantsis E, Lidov HG, Norton JH, Zinchenko N, Gruber HE, Thresher R, Blake DJ, Ashar J, Rosenfeld J, Lu QL (2010) Fukutin-related protein is essential for mouse muscle, brain and eye development and mutation recapitulates the wide clinical spectrums of dystroglycanopathies. *Hum Mol Genet* 19: 3995-4006.
- Chen H, Firestein BL (2007) RhoA regulates dendrite branching in hippocampal neurons by decreasing cypin protein levels. *J Neurosci* 27: 8378-8386.
- Chenn A, McConnell SK (1995) Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* 82: 631-641.
- Chew S, Balasubramanian R, Chan WM, Kang PB, Andrews C, Webb BD, MacKinnon SE, Oystreck DT, Rankin J, Crawford TO, Geraghty M, Pomeroy SL, Crowley WF, Jr., Jabs EW, Hunter DG, Grant PE, Engle EC (2013) A novel syndrome caused by the E410K amino acid substitution in the neuronal beta-tubulin isotype 3. *Brain* 136: 522-535.
- Chong SS, Pack SD, Roschke AV, Tanigami A, Carrozzo R, Smith AC, Dobyns WB, Ledbetter DH (1997) A revision of the lissencephaly and Miller-Dieker syndrome critical regions in chromosome 17p13.3. *Hum Mol Genet* 6: 147-155.
- Chung WJ, Kindler S, Seidenbecher C, Garner CC (1996) MAP2a, an alternatively spliced variant of microtubule-associated protein 2. *J Neurochem* 66: 1273-1281.
- Cleveland DW (1987) The multitubulin hypothesis revisited: what have we learned? *J Cell Biol* 104: 381-383.
- Cohen D, Segal M, Reiner O (2008) Doublecortin supports the development of dendritic arbors in primary hippocampal neurons. *Dev Neurosci* 30: 187-199.
- Colasante G, Simonet JC, Calogero R, Crispi S, Sessa A, Cho G, Golden JA, Broccoli V (2013) ARX Regulates Cortical Intermediate Progenitor Cell Expansion and Upper Layer Neuron Formation Through Repression of Cdkn1c. *Cereb Cortex*.

- Conde C, Caceres A (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 10: 319-332.
- Cushion TD, Dobyns WB, Mullins JG, Stoodley N, Chung SK, Fry AE, Hehr U, Gunny R, Aylsworth AS, Prabhakar P, Uyanik G, Rankin J, Rees MI, Pilz DT (2013) Overlapping cortical malformations and mutations in TUBB2B and TUBA1A. *Brain* 136: 536-548.
- Daniels M (1975) The role of microtubules in the growth and stabilization of nerve fibers. *Ann N Y Acad Sci* 253: 535-544.
- de Anda FC, Pollarolo G, Da Silva JS, Camoletto PG, Feiguin F, Dotti CG (2005) Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature* 436: 704-708.
- de Klein A, Muijtjens M, van Os R, Verhoeven Y, Smit B, Carr AM, Lehmann AR, Hoeijmakers JH (2000) Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol* 10: 479-482.
- DeFelipe J (2002) Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Prog Brain Res* 136: 215-238.
- del Rio JA, Martinez A, Fonseca M, Auladell C, 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.
- Del Rio JA, Soriano E, Ferrer I (1992) Development of GABA-immunoreactivity in the neocortex of the mouse. *J Comp Neurol* 326: 501-526.
- 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.
- Dennis K, Uittenbogaard M, Chiamello A, Moody SA (2002) Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the rat neuron-specific Class III beta-tubulin gene. *Gene* 294: 269-277.
- Dent EW, Callaway JL, Szebenyi G, Baas PW, Kalil K (1999) Reorganization and movement of microtubules in axonal growth cones and developing interstitial branches. *J Neurosci* 19: 8894-8908.
- Dent EW, Kalil K (2001) Axon branching requires interactions between dynamic microtubules and actin filaments. *J Neurosci* 21: 9757-9769.
- Deo RC, Schmidt EF, Elhabazi A, Togashi H, Burley SK, Strittmatter SM (2004) Structural bases for CRMP function in plexin-dependent semaphorin3A signaling. *EMBO J* 23: 9-22.
- Derer P, Derer M, Goffinet A (2001) Axonal secretion of Reelin by Cajal-Retzius cells: evidence from comparison of normal and Reln(Orl) mutant mice. *J Comp Neurol* 440: 136-143.
- 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 (1998) A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell* 92: 51-61.
- Deuel TA, Liu JS, Corbo JC, Yoo SY, Rorke-Adams LB, Walsh CA (2006) Genetic interactions between doublecortin and doublecortin-like kinase in neuronal migration and axon outgrowth. *Neuron* 49: 41-53.
- DiTella MC, Feiguin F, Carri N, Kosik KS, Caceres A (1996) MAP-1B/TAU functional redundancy during laminin-enhanced axonal growth. *J Cell Sci* 109 ( Pt 2): 467-477.
- Dixit R, Barnett B, Lazarus JE, Tokito M, Goldman YE, Holzbaur EL (2009) Microtubule plus-end tracking by CLIP-170 requires EB1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 492-497.
- Dobyns WB, Mirzaa G, Christian SL, Petras K, Roseberry J, Clark GD, Curry CJ, McDonald-McGinn D, Medne L, Zackai E, Parsons J, Zand DJ, Hisama FM, Walsh CA, Leventer RJ, Martin CL, Gajecka M, Shaffer LG (2008) Consistent chromosome abnormalities identify novel polymicrogyria loci in 1p36.3, 2p16.1-p23.1, 4q21.21-q22.1, 6q26-q27, and 21q2. *Am J Med Genet A* 146A: 1637-1654.
- Dobyns WB, Truwit CL, Ross ME, Matsumoto N, Pilz DT, Ledbetter DH, Gleeson JG, Walsh CA, Barkovich AJ (1999) Differences in the gyral pattern distinguish chromosome 17-linked and X-linked lissencephaly. *Neurology* 53: 270-277.
- Drewes G, Ebner A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89: 297-308.
- Dulabon L, Olson EC, Taglienti MG, Eisenhuth S, McGrath B, Walsh CA, Kreidberg JA, Anton ES (2000) Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* 27: 33-44.
- Englund C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RA, Bulfone A, Kowalczyk T, Hevner RF (2005) Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci* 25: 247-251.

- Falconer MM, Echeverri CJ, Brown DL (1992) Differential sorting of beta tubulin isotypes into colchicine-stable microtubules during neuronal and muscle differentiation of embryonal carcinoma cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 21: 313-325.
- Feng Y, Chen MH, Moskowitz IP, Mendonza AM, Vidali L, Nakamura F, Kwiatkowski DJ, Walsh CA (2006) Filamin A (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 19836-19841.
- Fietz SA, Kelava I, Vogt J, Wilsch-Brauninger M, Stenzel D, Fish JL, Corbeil D, Riehn A, Distler W, Nitsch R, Huttner WB (2010) OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nat Neurosci* 13: 690-699.
- Fish JL, Kosodo Y, Enard W, Paabo S, Huttner WB (2006) Aspm specifically maintains symmetric proliferative divisions of neuroepithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10438-10443.
- Fluckiger AC, Marcy G, Marchand M, Negre D, Cosset FL, Mitalipov S, Wolf D, Savatier P, Dehay C (2006) Cell cycle features of primate embryonic stem cells. *Stem Cells* 24: 547-556.
- Francis F, Meyer G, Fallet-Bianco C, Moreno S, Kappeler C, Socorro AC, Tuy FP, Beldjord C, Chelly J (2006) Human disorders of cortical development: from past to present. *Eur J Neurosci* 23: 877-893.
- Friocourt G, Kanatani S, Tabata H, Yozu M, Takahashi T, Antypa M, Raguene O, Chelly J, Ferec C, Nakajima K, Parnavelas JG (2008) Cell-autonomous roles of ARX in cell proliferation and neuronal migration during corticogenesis. *J Neurosci* 28: 5794-5805.
- Friocourt G, Liu JS, Antypa M, Rakic S, Walsh CA, Parnavelas JG (2007) Both doublecortin and doublecortin-like kinase play a role in cortical interneuron migration. *J Neurosci* 27: 3875-3883.
- Fukata Y, Itoh TJ, Kimura T, Menager C, Nishimura T, Shiromizu T, Watanabe H, Inagaki N, Iwamatsu A, Hotani H, Kaibuchi K (2002) CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat Cell Biol* 4: 583-591.
- Gaertig J, Cruz MA, Bowen J, Gu L, Pennock DG, Gorovsky MA (1995) Acetylation of lysine 40 in alpha-tubulin is not essential in *Tetrahymena thermophila*. *J Cell Biol* 129: 1301-1310.
- Gambello MJ, Darling DL, Yingling J, Tanaka T, Gleeson JG, Wynshaw-Boris A (2003) Multiple dose-dependent effects of Lis1 on cerebral cortical development. *J Neurosci* 23: 1719-1729.
- Garcia-Moreno F, Lopez-Mascaraque L, De Carlos JA (2007) Origins and migratory routes of murine Cajal-Retzius cells. *J Comp Neurol* 500: 419-432.
- Garner CC, Tucker RP, Matus A (1988) Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature* 336: 674-677.
- Gelman DM, Martini FJ, Nobrega-Pereira S, Pierani A, Kessaris N, Marin O (2009) The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons. *J Neurosci* 29: 9380-9389.
- Genin A, Desir J, Lambert N, Biervliet M, Van Der Aa N, Pierquin G, Killian A, Tosi M, Urbina M, Lefort A, Libert F, Pirson I, Abramowicz M (2012) Kinetochore KMN network gene CASC5 mutated in primary microcephaly. *Hum Mol Genet* 21: 5306-5317.
- Geraldo S, Khanzada UK, Parsons M, Chilton JK, Gordon-Weeks PR (2008) Targeting of the F-actin-binding protein drebrin by the microtubule plus-tip protein EB3 is required for neuritogenesis. *Nat Cell Biol* 10: 1181-1189.
- Gleeson JG (2000) Classical lissencephaly and double cortex (subcortical band heterotopia): LIS1 and doublecortin. *Curr Opin Neurol* 13: 121-125.
- Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, Cooper EC, Dobyns WB, Minnerath SR, Ross ME, Walsh CA (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.
- Gonchar Y, Burkhalter A (1997) Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cereb Cortex* 7: 347-358.
- Gonzalez-Billault C, Avila J, Caceres A (2001) Evidence for the role of MAP1B in axon formation. *Mol Biol Cell* 12: 2087-2098.
- Gonzalez-Billault C, Engelke M, Jimenez-Mateos EM, Wandosell F, Caceres A, Avila J (2002) Participation of structural microtubule-associated proteins (MAPs) in the development of neuronal polarity. *J Neurosci Res* 67: 713-719.
- Gonzalez-Billault C, Jimenez-Mateos EM, Caceres A, Diaz-Nido J, Wandosell F, Avila J (2004) Microtubule-associated protein 1B function during normal development, regeneration, and pathological conditions in the nervous system. *J Neurobiol* 58: 48-59.
- Gopal PP, Simonet JC, Shapiro W, Golden JA (2010) Leading process branch instability in Lis1<sup>+/-</sup> nonradially migrating interneurons. *Cereb Cortex* 20: 1497-1505.
- Gordon-Weeks PR (2004) Microtubules and growth cone function. *J Neurobiol* 58: 70-83.

- Gotz M, Barde YA (2005) Radial glial cells defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons. *Neuron* 46: 369-372.
- Gotz M, Huttner WB (2005) The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 777-788.
- Gruber R, Zhou Z, Sukchev M, Joerss T, Frappart PO, Wang ZQ (2011) MCPH1 regulates the neuroprogenitor division mode by coupling the centrosomal cycle with mitotic entry through the Chk1-Cdc25 pathway. *Nat Cell Biol* 13: 1325-1334.
- Gu J, Firestein BL, Zheng JQ (2008) Microtubules in dendritic spine development. *J Neurosci* 28: 12120-12124.
- Guernsey DL, Jiang H, Hussin J, Arnold M, Bouyakdan K, Perry S, Babineau-Sturk T, Beis J, Dumas N, Evans SC, Ferguson M, Matsuoka M, Macgillivray C, Nightingale M, Patry L, Rideout AL, Thomas A, Orr A, Hoffmann I, Michaud JL, Awadalla P, Meek DC, Ludman M, Samuels ME (2010) Mutations in centrosomal protein CEP152 in primary microcephaly families linked to MCPH4. *Am J Hum Genet* 87: 40-51.
- Guillaud L, Bosc C, Fourest-Lieuvin A, Denarier E, Pirollet F, Lafanechere L, Job D (1998) STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. *J Cell Biol* 142: 167-179.
- Gulsuner S, Tekinay AB, Doerschner K, Boyaci H, Bilguvar K, Unal H, Ors A, Onat OE, Atalar E, Basak AN, Topaloglu H, Kansu T, Tan M, Tan U, Gunel M, Ozcelik T (2011) Homozygosity mapping and targeted genomic sequencing reveal the gene responsible for cerebellar hypoplasia and quadrupedal locomotion in a consanguineous kindred. *Genome Res* 21: 1995-2003.
- Guo J, Walss-Bass C, Luduena RF (2010) The beta isotypes of tubulin in neuronal differentiation. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67: 431-441.
- Guo J, Yang Z, Song W, Chen Q, Wang F, Zhang Q, Zhu X (2006) Nudel contributes to microtubule anchoring at the mother centriole and is involved in both dynein-dependent and -independent centrosomal protein assembly. *Mol Biol Cell* 17: 680-689.
- Gupta A, Tsai LH, Wynshaw-Boris A (2002) Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Genet* 3: 342-355.
- Gupta KK, Joyce MV, Slabbekoorn AR, Zhu ZC, Paulson BA, Boggess B, Goodson HV (2010) Probing interactions between CLIP-170, EB1, and microtubules. *J Mol Biol* 395: 1049-1062.
- Hack I, Bancila M, Loulier K, Carroll P, 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 AS, Hummerich H, Nicholson S, Morgan PJ, Oozageer R, Priestley JV, Averill S, King VR, 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 DT, Russ AP, Stumm G, Martin JE, Fisher EM (2003) Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* 300: 808-812.
- Halpain S, Dehmelt L (2006) The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 7: 224.
- Hammond JW, Huang CF, Kaech S, Jacobson C, Banker G, Verhey KJ (2010) Posttranslational modifications of tubulin and the polarized transport of kinesin-1 in neurons. *Mol Biol Cell* 21: 572-583.
- Hansen DV, Lui JH, Parker PR, Kriegstein AR (2010) Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* 464: 554-561.
- Harada A, Takei Y, Kanai Y, Tanaka Y, Nonaka S, Hirokawa N (1998) Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. *J Cell Biol* 141: 51-59.
- Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB (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.
- Hehr U, Pineda-Alvarez DE, Uyanik G, Hu P, Zhou N, Hehr A, Schell-Apacik C, Altus C, Daumer-Haas C, Meiner A, Steuernagel P, Roessler E, Winkler J, Muenke M (2010) Heterozygous mutations in SIX3 and SHH are associated with schizencephaly and further expand the clinical spectrum of holoprosencephaly. *Hum Genet* 127: 555-561.
- Heo K, Ha SH, Chae YC, Lee S, Oh YS, Kim YH, Kim SH, Kim JH, Mizoguchi A, Itoh TJ, Kwon HM, Ryu SH, Suh PG (2006) RGS2 promotes formation of neurites by stimulating microtubule polymerization. *Cell Signal* 18: 2182-2192.
- Hersheson J, Mencacci NE, Davis M, Macdonald N, Trabzuni D, Ryten M, Pittman A, Paudel R, Kara E, Fawcett K, Plagnol V, Bhatia KP, Medlar AJ, Stanescu HC, Hardy J, Kleita R, Wood NW, Houlden H (2012) Mutations in the autoregulatory domain of beta-tubulin 4a cause hereditary dystonia. *Ann Neurol*.

- Hevner RF, Miyashita-Lin E, Rubenstein JL (2002) Cortical and thalamic axon pathfinding defects in *Tbr1*, *Gbx2*, and *Pax6* mutant mice: evidence that cortical and thalamic axons interact and guide each other. *J Comp Neurol* 447: 8-17.
- Hevner RF, Shi L, Justice N, Hsueh Y, Sheng M, Smiga S, Bulfone A, Goffinet AM, Campagnoni AT, Rubenstein JL (2001) *Tbr1* regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* 29: 353-366.
- Hirotsune S, Fleck MW, Gambello MJ, Bix GJ, Chen A, Clark GD, Ledbetter DH, McBain CJ, Wynshaw-Boris A (1998) Graded reduction of *Pafah1b1* (*Lis1*) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nat Genet* 19: 333-339.
- Hoffarth RM, Johnston JG, Krushel LA, van der Kooy D (1995) The mouse mutation *reeler* causes increased adhesion within a subpopulation of early postmitotic cortical neurons. *J Neurosci* 15: 4838-4850.
- Homma N, Takei Y, Tanaka Y, Nakata T, Terada S, Kikkawa M, Noda Y, Hirokawa N (2003) Kinesin superfamily protein 2A (*KIF2A*) functions in suppression of collateral branch extension. *Cell* 114: 229-239.
- Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JO, Martin ND, Walsh CA (2000) Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human *RELN* mutations. *Nat Genet* 26: 93-96.
- Hotta A, Inatome R, Yuasa-Kawada J, Qin Q, Yamamura H, Yanagi S (2005) Critical role of collapsin response mediator protein-associated molecule *CRAM* for filopodia and growth cone development in neurons. *Mol Biol Cell* 16: 32-39.
- Hoyle HD, Raff EC (1990) Two *Drosophila* beta tubulin isoforms are not functionally equivalent. *J Cell Biol* 111: 1009-1026.
- Hu H, Li J, Gagen CS, Gray NW, Zhang Z, Qi Y, Zhang P (2011) Conditional knockout of protein O-mannosyltransferase 2 reveals tissue-specific roles of O-mannosyl glycosylation in brain development. *J Comp Neurol* 519: 1320-1337.
- Hu X, Viesselmann C, Nam S, Merriam E, Dent EW (2008) Activity-dependent dynamic microtubule invasion of dendritic spines. *J Neurosci* 28: 13094-13105.
- Huang J, Roberts AJ, Leschziner AE, Reck-Peterson SL (2012) *Lis1* acts as a "clutch" between the ATPase and microtubule-binding domains of the dynein motor. *Cell* 150: 975-986.
- Huttner WB, Brand M (1997) Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells. *Curr Opin Neurobiol* 7: 29-39.
- Illenberger S, Drewes G, Trinczek B, Biernat J, Meyer HE, Olmsted JB, Mandelkow EM, Mandelkow E (1996) Phosphorylation of microtubule-associated proteins *MAP2* and *MAP4* by the protein kinase *p110mark*. Phosphorylation sites and regulation of microtubule dynamics. *J Biol Chem* 271: 10834-10843.
- Inagaki N, Chihara K, Arimura N, Menager C, Kawano Y, Matsuo N, Nishimura T, Amano M, Kaibuchi K (2001) *CRMP-2* induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 4: 781-782.
- Jackson AP, Eastwood H, Bell SM, Adu J, Toomes C, Carr IM, Roberts E, Hampshire DJ, Crow YJ, Mighell AJ, Karbani G, Jafri H, Rashid Y, Mueller RF, Markham AF, Woods CG (2002) Identification of microcephalin, a protein implicated in determining the size of the human brain. *Am J Hum Genet* 71: 136-142.
- Jaglin XH, Poirier K, Saillour Y, Buhler E, Tian G, Bahi-Buisson N, Fallet-Bianco C, Phan-Dinh-Tuy F, Kong XP, Bomont P, Castelnaud-Ptakhine L, Odent S, Loget P, Kossorotoff M, Snoeck I, Plessis G, Parent P, Beldjord C, Cardoso C, Represa A, Flint J, Keays DA, Cowan NJ, Chelly J (2009) Mutations in the beta-tubulin gene *TUBB2B* result in asymmetrical polymicrogyria. *Nat Genet* 41: 746-752.
- Jansen A, Andermann E (2005) Genetics of the polymicrogyria syndromes. *J Med Genet* 42: 369-378.
- Jansen AC, Oostra A, Desprechins B, De Vlaeminck Y, Verhelst H, Regal L, Verloo P, Bockaert N, Keymolen K, Seneca S, De Meirleir L, Lissens W (2011) *TUBA1A* mutations: from isolated lissencephaly to familial polymicrogyria. *Neurology* 76: 988-992.
- Jaworski J, Kapitein LC, Gouveia SM, Dortland BR, Wulf PS, Grigoriev I, Camera P, Spangler SA, Di Stefano P, Demmers J, Krugers H, Defilippi P, Akhmanova A, Hoogenraad CC (2009) Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron* 61: 85-100.
- Job D, Rauch CT, Fischer EH, Margolis RL (1982) Recycling of cold-stable microtubules: evidence that cold stability is due to substoichiometric polymer blocks. *Biochemistry* 21: 509-515.
- Jones EG (1975) Varieties and distribution of non-pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 160: 205-267.
- Judkins AR, Martinez D, Ferreira P, Dobyns WB, Golden JA (2012) Polymicrogyria includes fusion of the molecular layer and decreased neuronal populations but normal cortical laminar organization. *J Neuropathol Exp Neurol* 70: 438-443.

- Kappeler C, Dhenain M, Phan Dinh Tuy F, Saillour Y, Marty S, Fallet-Bianco C, Souville I, Souil E, Pinard JM, Meyer G, Encha-Razavi F, Volk A, Beldjord C, Chelly J, Francis F (2007) Magnetic resonance imaging and histological studies of corpus callosal and hippocampal abnormalities linked to doublecortin deficiency. *J Comp Neurol* 500: 239-254.
- Kappeler C, Saillour Y, Baudoin JP, Tuy FP, Alvarez C, Houbron C, Gaspar P, Hamard G, Chelly J, Metin C, Francis F (2006) Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from doublecortin knockout mice. *Hum Mol Genet* 15: 1387-1400.
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 7: 476-486.
- Keays DA, Tian G, Poirier K, Huang GJ, Siebold C, Cleak J, Oliver PL, Fray M, Harvey RJ, Molnar Z, Pinon MC, Dear N, Valdar W, Brown SD, Davies KE, Rawlins JN, Cowan NJ, Nolan P, Chelly J, Flint J (2007) Mutations in alpha-tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans. *Cell* 128: 45-57.
- Khodiyar VK, Maltais LJ, Ruef BJ, Sneddon KM, Smith JR, Shimoyama M, Cabral F, Dumontet C, Dutcher SK, Harvey RJ, Lafanechere L, Murray JM, Nogales E, Piquemal D, Stanchi F, Povey S, Lovering RC (2007) A revised nomenclature for the human and rodent alpha-tubulin gene family. *Genomics* 90: 285-289.
- Kitamura K, Yanazawa M, Sugiyama N, Miura H, Iizuka-Kogo A, Kusaka M, Omichi K, Suzuki R, Kato-Fukui Y, Kamiirisa K, Matsuo M, Kamijo S, Kasahara M, Yoshioka H, Ogata T, Fukuda T, Kondo I, Kato M, Dobyns WB, Yokoyama M, Morohashi K (2002) Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nat Genet* 32: 359-369.
- Koirala S, Jin Z, Piao X, Corfas G (2009) GPR56-regulated granule cell adhesion is essential for rostral cerebellar development. *J Neurosci* 29: 7439-7449.
- Koizumi H, Higginbotham H, Poon T, Tanaka T, Brinkman BC, Gleeson JG (2006a) Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain. *Nat Neurosci* 9: 779-786.
- Koizumi H, Tanaka T, Gleeson JG (2006b) Doublecortin-like kinase functions with doublecortin to mediate fiber tract decussation and neuronal migration. *Neuron* 49: 55-66.
- Komada M, Saitsu H, Kinboshi M, Miura T, Shiota K, Ishibashi M (2008) Hedgehog signaling is involved in development of the neocortex. *Development* 135: 2717-2727.
- Komarova YA, Akhmanova AS, Kojima S, Galjart N, Borisy GG (2002) Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo. *J Cell Biol* 159: 589-599.
- Kondo-lida E, Kobayashi K, Watanabe M, Sasaki J, Kumagai T, Koide H, Saito K, Osawa M, Nakamura Y, Toda T (1999) Novel mutations and genotype-phenotype relationships in 107 families with Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). *Hum Mol Genet* 8: 2303-2309.
- Konishi Y, Setou M (2009) Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nat Neurosci* 12: 559-567.
- Konno D, Shioi G, Shitamukai A, Mori A, Kiyonari H, Miyata T, Matsuzaki F (2008) Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nat Cell Biol* 10: 93-101.
- Kosodo Y, Roper K, Haubensak W, Marzesco AM, Corbeil D, Huttner WB (2004) Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *EMBO J* 23: 2314-2324.
- Kriegstein A, Noctor S, Martinez-Cerdeno V (2006) Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nat Rev Neurosci* 7: 883-890.
- Kriegstein AR, Gotz M (2003) Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia* 43: 37-43.
- Kroll TT, O'Leary DD (2005) Ventralized dorsal telencephalic progenitors in Pax6 mutant mice generate GABA interneurons of a lateral ganglionic eminence fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 7374-7379.
- Kumar A, Girimaji SC, Duvvari MR, Blanton SH (2009) Mutations in STIL, encoding a pericentriolar and centrosomal protein, cause primary microcephaly. *Am J Hum Genet* 84: 286-290.
- Kwan AC, Dombeck DA, Webb WW (2008) Polarized microtubule arrays in apical dendrites and axons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 11370-11375.
- L'Hernault SW, Rosenbaum JL (1983) Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified in the flagella during flagellar assembly. *J Cell Biol* 97: 258-263.
- L'Hernault SW, Rosenbaum JL (1985a) Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. *Biochemistry* 24: 473-478.
- L'Hernault SW, Rosenbaum JL (1985b) Reversal of the posttranslational modification on Chlamydomonas flagellar alpha-tubulin occurs during flagellar resorption. *J Cell Biol* 100: 457-462.



- Lasek RJ (1986) Polymer sliding in axons. *J Cell Sci Suppl* 5: 161-179.
- 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.
- Lee H, Engel U, Rusch J, Scherrer S, Sheard K, Van Vactor D (2004) The microtubule plus end tracking protein Orbit/MAST/CLASP acts downstream of the tyrosine kinase Abl in mediating axon guidance. *Neuron* 42: 913-926.
- Lewis SA, Cowan NJ (1988) Complex regulation and functional versatility of mammalian alpha- and beta-tubulin isoforms during the differentiation of testis and muscle cells. *J Cell Biol* 106: 2023-2033.
- Li J, Yu M, Feng G, Hu H, Li X (2011) Breaches of the pial basement membrane are associated with defective dentate gyrus development in mouse models of congenital muscular dystrophies. *Neurosci Lett* 505: 19-24.
- Li S, Jin Z, Koirala S, Bu L, Xu L, Hynes RO, Walsh CA, Corfas G, Piao X (2008) GPR56 regulates pial basement membrane integrity and cortical lamination. *J Neurosci* 28: 5817-5826.
- Lian G, Lu J, Hu J, Zhang J, Cross SH, Ferland RJ, Sheen VL (2012) Filamin A regulates neural progenitor proliferation and cortical size through Wee1-dependent Cdk1 phosphorylation. *J Neurosci* 32: 7672-7684.
- Liang Y, Gao H, Lin SY, Peng G, Huang X, Zhang P, Goss JA, Brunicaudi FC, Multani AS, Chang S, Li K (2010) BRIT1/MCPH1 is essential for mitotic and meiotic recombination DNA repair and maintaining genomic stability in mice. *PLoS Genet* 6: e1000826.
- Lizarraga SB, Margossian SP, Harris MH, Campagna DR, Han AP, Blevins S, Mudbhary R, Barker JE, Walsh CA, Fleming MD (2010) Cdk5rap2 regulates centrosome function and chromosome segregation in neuronal progenitors. *Development* 137: 1907-1917.
- Lohmann K, Wilcox RA, Winkler S, Ramirez A, Rakovic A, Park JS, Arns B, Lohnau T, Groen J, Kasten M, Bruggemann N, Hagenah J, Schmidt A, Kaiser FJ, Kumar KR, Zschiedrich K, Alvarez-Fischer D, Altenmüller E, Ferbert A, Lang AE, Munchau A, Kostic V, Simonyan K, Agzarian M, Ozelius LJ, Langeveld AP, Sue CM, Tijssen MA, Klein C (2012) Whispering dysphonia (DYT4 dystonia) is caused by a mutation in the TUBB4 gene. *Ann Neurol*.
- Longman C, Brockington M, Torelli S, Jimenez-Mallebrera C, Kennedy C, Khalil N, Feng L, Saran RK, Voit T, Merlini L, Sewry CA, Brown SC, Muntoni F (2003) Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Hum Mol Genet* 12: 2853-2861.
- Lopez-Bendito G, Sturgess K, Erdelyi F, Szabo G, Molnar Z, Paulsen O (2004) Preferential origin and layer destination of GAD65-GFP cortical interneurons. *Cereb Cortex* 14: 1122-1133.
- LoTurco JJ, Bai J (2006) The multipolar stage and disruptions in neuronal migration. *Trends Neurosci* 29: 407-413.
- Lowe J, Li H, Downing KH, Nogales E (2001) Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *J Mol Biol* 313: 1045-1057.
- Mallamaci A, Mercurio S, Muzio L, Cecchi C, Pardini CL, Gruss P, Boncinelli E (2000) The lack of Emx2 causes impairment of Reelin signaling and defects of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 20: 1109-1118.
- Manent JB, Wang Y, Chang Y, Paramasivam M, LoTurco JJ (2009) Dcx reexpression reduces subcortical band heterotopia and seizure threshold in an animal model of neuronal migration disorder. *Nat Med* 15: 84-90.
- Manzini MC, Tambunan DE, Hill RS, Yu TW, Maynard TM, Heinzen EL, Shianna KV, Stevens CR, Partlow JN, Barry BJ, Rodriguez J, Gupta VA, Al-Qudah AK, Eyaid WM, Friedman JM, Salih MA, Clark R, Moroni I, Mora M, Beggs AH, Gabriel SB, Walsh CA (2012) Exome sequencing and functional validation in zebrafish identify GTDC2 mutations as a cause of Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet* 91: 541-547.
- Maor-Nof M, Homma N, Raanan C, Nof A, Hirokawa N, Yaron A (2013) Axonal pruning is actively regulated by the microtubule-destabilizing protein kinesin superfamily protein 2A. *Cell Rep* 3: 971-977.
- Marin-Padilla M (1998) Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends Neurosci* 21: 64-71.
- Marin O, Anderson SA, Rubenstein JL (2000) Origin and molecular specification of striatal interneurons. *J Neurosci* 20: 6063-6076.
- Marin O, Rubenstein JL (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2: 780-790.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5: 793-807.

- Martinez-Cerdeno V, Noctor SC, Kriegstein AR (2006) The role of intermediate progenitor cells in the evolutionary expansion of the cerebral cortex. *Cereb Cortex* 16 Suppl 1: i152-161.
- Matsumoto N, Leventer RJ, Kuc JA, Mewborn SK, Dudlicek LL, Ramocki MB, Pilz DT, Mills PL, Das S, Ross ME, Ledbetter DH, Dobyns WB (2001) Mutation analysis of the DCX gene and genotype/phenotype correlation in subcortical band heterotopia. *Eur J Hum Genet* 9: 5-12.
- Menezes JR, Luskin MB (1994) Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon. *J Neurosci* 14: 5399-5416.
- Meyer G, Perez-Garcia CG, Abraham H, Caput D (2002) Expression of p73 and Reelin in the developing human cortex. *J Neurosci* 22: 4973-4986.
- Mimori-Kiyosue Y, Grigoriev I, Lansbergen G, Sasaki H, Matsui C, Severin F, Galjart N, Grosveld F, Vorobjev I, Tsukita S, Akhmanova A (2005) CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *J Cell Biol* 168: 141-153.
- Mimori-Kiyosue Y, Shiina N, Tsukita S (2000) Adenomatous polyposis coli (APC) protein moves along microtubules and concentrates at their growing ends in epithelial cells. *J Cell Biol* 148: 505-518.
- Miner JH, Li C, Mudd JL, Go G, Sutherland AE (2004) Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development* 131: 2247-2256.
- Mitchell TN, Free SL, Williamson KA, Stevens JM, Churchill AJ, Hanson IM, Shorvon SD, Moore AT, van Heyningen V, Sisodiya SM (2003) Polymicrogyria and absence of pineal gland due to PAX6 mutation. *Ann Neurol* 53: 658-663.
- Miyata T, Kawaguchi A, Saito K, Kawano M, Muto T, Ogawa M (2004) Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* 131: 3133-3145.
- Miyoshi G, Hjerling-Leffler J, Karayannis T, Sousa VH, Butt SJ, Battiste J, Johnson JE, Machold RP, Fishell G (2010) Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons. *J Neurosci* 30: 1582-1594.
- Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD (2007) Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 8: 427-437.
- Moore CA, Perderiset M, Francis F, Chelly J, Houdusse A, Milligan RA (2004) Mechanism of microtubule stabilization by doublecortin. *Mol Cell* 14: 833-839.
- Morest DK (1970) A study of neurogenesis in the forebrain of opossum pouch young. *Z Anat Entwicklungsgesch* 130: 265-305.
- Morris-Rosendahl DJ, Najm J, Lachmeijer AM, Sztriha L, Martins M, Kuechler A, Haug V, Zeschnigk C, Martin P, Santos M, Vasconcelos C, Omran H, Kraus U, Van der Knaap MS, Schuierer G, Kutsche K, Uyanik G (2008) Refining the phenotype of alpha-1a Tubulin (TUBA1A) mutation in patients with classical lissencephaly. *Clin Genet* 74: 425-433.
- 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.
- Nagano T, Morikubo S, 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.
- Nakagawa H, Koyama K, Murata Y, Morito M, Akiyama T, Nakamura Y (2000) EB3, a novel member of the EB1 family preferentially expressed in the central nervous system, binds to a CNS-specific APC homologue. *Oncogene* 19: 210-216.
- Nieto M, Monuki ES, Tang H, Imitola J, Haubst N, Khoury SJ, Cunningham J, Gotz M, Walsh CA (2004) Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex. *J Comp Neurol* 479: 168-180.
- Niwa S, Takahashi H, Hirokawa N (2013) beta-Tubulin mutations that cause severe neuropathies disrupt axonal transport. *EMBO J* 32: 1352-1364.
- Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 7: 136-144.
- Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Kriegstein AR (2008) Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J Comp Neurol* 508: 28-44.
- Noda Y, Sato-Yoshitake R, Kondo S, Nangaku M, Hirokawa N (1995) KIF2 is a new microtubule-based anterograde motor that transports membranous organelles distinct from those carried by kinesin heavy chain or KIF3A/B. *J Cell Biol* 129: 157-167.
- Nogales E, Whittaker M, Milligan RA, Downing KH (1999) High-resolution model of the microtubule. *Cell* 96: 79-88.

- Nogales E, Wolf SG, Downing KH (1998) Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391: 199-203.
- Nonaka-Kinoshita M, Reillo I, Artegiani B, Angeles Martinez-Martinez M, Nelson M, Borrell V, Calegari F (2013) Regulation of cerebral cortex size and folding by expansion of basal progenitors. *EMBO J*.
- O'Driscoll M, Ruiz-Perez VL, Woods CG, Jeggo PA, Goodship JA (2003) A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet* 33: 497-501.
- Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagyu K, Seike M, Ikenaka K, Yamamoto H, Mikoshiba K (1995) The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron* 14: 899-912.
- Paturle-Lafanechere L, Edde B, Denoulet P, Van Dorsselaer A, Mazarguil H, Le Caer JP, Wehland J, Job D (1991) Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochemistry* 30: 10523-10528.
- Peris L, Thery M, Faure J, Saoudi Y, Lafanechere L, Chilton JK, Gordon-Weeks P, Galjart N, Bornens M, Wordeman L, Wehland J, Andrieux A, 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.
- Peris L, Wagenbach M, Lafanechere L, Brocard J, Moore AT, Kozielski F, Job D, Wordeman L, Andrieux A (2009) Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J Cell Biol* 185: 1159-1166.
- Piao X, Hill RS, Bodell A, Chang BS, Basel-Vanagaite L, Straussberg R, Dobyns WB, Qasrawi B, Winter RM, Innes AM, Voit T, Ross ME, Michaud JL, Descarie JC, Barkovich AJ, Walsh CA (2004) G protein-coupled receptor-dependent development of human frontal cortex. *Science* 303: 2033-2036.
- Pilaz LJ, Patti D, Marcy G, Ollier E, Pfister S, Douglas RJ, Betizeau M, Gautier E, Cortay V, Doerflinger N, Kennedy H, Dehay C (2009) Forced G1-phase reduction alters mode of division, neuron number, and laminar phenotype in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21924-21929.
- Pilz DT, Kuc J, Matsumoto N, Bodurtha J, Bernadi B, Tassinari CA, Dobyns WB, Ledbetter DH (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.
- Pilz DT, Matsumoto N, Minnerath S, Mills P, Gleeson JG, Allen KM, Walsh CA, Barkovich AJ, Dobyns WB, Ledbetter DH, Ross ME (1998) LIS1 and XLIS (DCX) mutations cause most classical lissencephaly, but different patterns of malformation. *Hum Mol Genet* 7: 2029-2037.
- Poirier K, Abriol J, Souville I, Laroche-Raynaud C, Beldjord C, Gilbert B, Chelly J, Bienvenu T (2005) Maternal mosaicism for mutations in the ARX gene in a family with X linked mental retardation. *Hum Genet* 118: 45-48.
- Poirier K, Keays DA, Francis F, Saillour Y, Bahi N, Manouvrier S, Fallet-Bianco C, Pasquier L, Toutain A, Tuy FP, Bienvenu T, Joriot S, Odent S, Ville D, Desguerre I, Goldenberg A, Moutard ML, Fryns JP, van Esch H, Harvey RJ, Siebold C, Flint J, Beldjord C, Chelly J (2007) Large spectrum of lissencephaly and pachygyria phenotypes resulting from de novo missense mutations in tubulin alpha 1A (TUBA1A). *Hum Mutat* 28: 1055-1064.
- Poirier K, Lebrun N, Broix L, Tian G, Saillour Y, Boscheron C, Parrini E, Valence S, Pierre BS, Oger M, Lacombe D, Genevieve D, Fontana E, Darra F, Cances C, Barth M, Bonneau D, Bernadina BD, N'Guyen S, Gitiaux C, Parent P, des Portes V, Pedespan JM, Legrez V, Castelnau-Ptakine L, Nitschke P, Hieu T, Masson C, Zelenika D, Andrieux A, Francis F, Guerrini R, Cowan NJ, Bahi-Buisson N, Chelly J (2013) Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nat Genet* 45: 639-647.
- Poirier K, Saillour Y, Bahi-Buisson N, Jaglin XH, Fallet-Bianco C, Nabbout R, Castelnau-Ptakine L, Roubertie A, Attie-Bitach T, Desguerre I, Genevieve D, Barnerias C, Keren B, Lebrun N, Boddaert N, Encha-Razavi F, Chelly J (2010) Mutations in the neuronal tubulin subunit TUBB3 result in malformation of cortical development and neuronal migration defects. *Hum Mol Genet* 19: 4462-4473.
- Poirier K, Saillour Y, Fourniol F, Francis F, Souville I, Valence S, Desguerre I, Marie Lepage J, Boddaert N, Line Jacquemont M, Beldjord C, Chelly J, Bahi-Buisson N (2012) Expanding the spectrum of TUBA1A-related cortical dysgenesis to Polymicrogyria. *Eur J Hum Genet* 21: 381-385.
- Poolos NP, Das S, Clark GD, Lardizabal D, Noebels JL, Wyllie E, Dobyns WB (2002) Males with epilepsy, complete subcortical band heterotopia, and somatic mosaicism for DCX. *Neurology* 58: 1559-1562.
- Pramparo T, Youn YH, Yingling J, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A (2010) Novel embryonic neuronal migration and proliferation defects in Dcx mutant mice are exacerbated by Lis1 reduction. *J Neurosci* 30: 3002-3012.

- Purro SA, Ciani L, Hoyos-Flight M, Stamatakou E, Siomou E, Salinas PC (2008) Wnt regulates axon behavior through changes in microtubule growth directionality: a new role for adenomatous polyposis coli. *J Neurosci* 28: 8644-8654.
- Qu C, Dwyer T, Shao Q, Yang T, Huang H, Liu G (2013) Direct binding of TUBB3 with DCC couples netrin-1 signaling to intracellular microtubule dynamics in axon outgrowth and guidance. *J Cell Sci* 126: 3070-3081.
- Quinn CC, Chen E, Kinjo TG, Kelly G, Bell AW, Elliott RC, McPherson PS, Hockfield S (2003) TUC-4b, a novel TUC family variant, regulates neurite outgrowth and associates with vesicles in the growth cone. *J Neurosci* 23: 2815-2823.
- Radmanesh F, Caglayan AO, Silhavy JL, Yilmaz C, Cantagrel V, Omar T, Rosti B, Kaymakcalan H, Gabriel S, Li M, Sestan N, Bilguvar K, Dobyns WB, Zaki MS, Gunel M, Gleeson JG (2013) Mutations in LAMB1 cause cobblestone brain malformation without muscular or ocular abnormalities. *Am J Hum Genet* 92: 468-474.
- Rakic P (1995) A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci* 18: 383-388.
- Rakic S, Yanagawa Y, Obata K, Faux C, Parnavelas JG, Nikolic M (2009) Cortical interneurons require p35/Cdk5 for their migration and laminar organization. *Cereb Cortex* 19: 1857-1869.
- Ramos RL, Bai J, LoTurco JJ (2006) Heterotopia formation in rat but not mouse neocortex after RNA interference knockdown of DCX. *Cereb Cortex* 16: 1323-1331.
- Raymond AA, Fish DR, Sisodiya SM, Alsanjari N, Stevens JM, Shorvon SD (1995) Abnormalities of gyration, heterotopias, tuberous sclerosis, focal cortical dysplasia, microdysgenesis, dysembryoplastic neuroepithelial tumour and dysgenesis of the archicortex in epilepsy. Clinical, EEG and neuroimaging features in 100 adult patients. *Brain* 118 ( Pt 3): 629-660.
- Redeker V, Levilliers N, Schmitter JM, Le Caer JP, Rossier J, Adoutte A, Bre MH (1994) Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science* 266: 1688-1691.
- Reed NA, Cai D, Blasius TL, Jih GT, Meyhofer E, Gaertig J, Verhey KJ (2006) Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol* 16: 2166-2172.
- Regnard C, Audebert S, Desbruyeres, Denoulet P, Edde B (1998) Tubulin polyglutamylase: partial purification and enzymatic properties. *Biochemistry* 37: 8395-8404.
- Reillo I, Borrell V (2012) Germinal zones in the developing cerebral cortex of ferret: ontogeny, cell cycle kinetics, and diversity of progenitors. *Cereb Cortex* 22: 2039-2054.
- Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, Wehnert M, Faustinella F, Dobyns WB, Caskey CT, Ledbetter DH (1993) Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature* 364: 717-721.
- Rice DS, Sheldon M, D'Arcangelo G, Nakajima K, Goldowitz D, Curran T (1998) Disabled-1 acts downstream of Reelin in a signaling pathway that controls laminar organization in the mammalian brain. *Development* 125: 3719-3729.
- Rizzoti K, Brunelli S, Carmignac D, Thomas PQ, Robinson IC, Lovell-Badge R (2004) SOX3 is required during the formation of the hypothalamo-pituitary axis. *Nat Genet* 36: 247-255.
- Robin NH, Taylor CJ, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Bingham P, Collins KJ, Earl D, Gill D, Granata T, Guerrini R, Katz N, Kimonis V, Lin JP, Lynch DR, Mohammed SN, Massey RF, McDonald M, Rogers RC, Splitt M, Stevens CA, Tischkowitz MD, Stoodley N, Leventer RJ, Pilz DT, Dobyns WB (2006) Polymicrogyria and deletion 22q11.2 syndrome: window to the etiology of a common cortical malformation. *Am J Med Genet A* 140: 2416-2425.
- Roll P, Rudolf G, Pereira S, Royer B, Scheffer IE, Massacrier A, Valenti MP, Roeckel-Trevisiol N, Jamali S, Beclin C, Seegmuller C, Metz-Lutz MN, Lemaingue A, Delepine M, Caloustian C, de Saint Martin A, Bruneau N, Depetris D, Mattei MG, Flori E, Robaglia-Schlupp A, Levy N, Neubauer BA, Ravid R, Marescaux C, Berkovic SF, Hirsch E, Lathrop M, Cau P, Szepietowski P (2006) SRPX2 mutations in disorders of language cortex and cognition. *Hum Mol Genet* 15: 1195-1207.
- Roscioli T, Kamsteeg EJ, Buysse K, Maystadt I, van Reeuwijk J, van den Elzen C, van Beusekom E, Riemersma M, Pfundt R, Vissers LE, Schraders M, Altunoglu U, Buckley MF, Brunner HG, Grisart B, Zhou H, Veltman JA, Gilissen C, Mancini GM, Delree P, Willemsen MA, Ramadza DP, Chitayat D, Bennett C, Sheridan E, Peeters EA, Tan-Sindhunata GM, de Die-Smulders CE, Devriendt K, Kayserili H, El-Hashash OA, Stemple DL, Lefeber DJ, Lin YY, van Bokhoven H (2012) Mutations in ISPD cause Walker-Warburg syndrome and defective glycosylation of alpha-dystroglycan. *Nat Genet* 44: 581-585.
- Russell DG, Miller D, Gull K (1984) Tubulin heterogeneity in the trypanosome *Crithidia fasciculata*. *Mol Cell Biol* 4: 779-790.

- Rymar VV, Sadikot AF (2007) Laminar fate of cortical GABAergic interneurons is dependent on both birthdate and phenotype. *J Comp Neurol* 501: 369-380.
- Saillour Y, Carion N, Quelin C, Leger PL, Boddaert N, Elie C, Toutain A, Mercier S, Barthez MA, Milh M, Joriot S, des Portes V, Philip N, Broglin D, Roubertie A, Pitelet G, Moutard ML, Pinard JM, Cances C, Kaminska A, Chelly J, Beldjord C, Bahi-Buisson N (2009) LIS1-related isolated lissencephaly: spectrum of mutations and relationships with malformation severity. *Arch Neurol* 66: 1007-1015.
- Saito T (2006) In vivo electroporation in the embryonic mouse central nervous system. *Nat Protoc* 1: 1552-1558.
- Salmi M, Bruneau N, Cillario J, Lozovaya N, Massacrier A, Buhler E, Cloarec R, Tsintsadze T, Watrin F, Tsintsadze V, Zimmer C, Villard C, Lafitte D, Cardoso C, Bao L, Lesca G, Rudolf G, Muscatelli F, Pauly V, Khalilov I, Durbec P, Ben-Ari Y, Burnashev N, Represa A, Szepietowski P (2013) Tubacin prevents neuronal migration defects and epileptic activity caused by rat *SrpX2* silencing in utero. *Brain*.
- Sandblad L, Busch KE, Tittmann P, Gross H, Brunner D, Hoenger A (2006) The *Schizosaccharomyces pombe* EB1 homolog Mal3p binds and stabilizes the microtubule lattice seam. *Cell* 127: 1415-1424.
- Sapir T, Sapoznik S, Levy T, Finkelshtein D, Shmueli A, Timm T, Mandelkow EM, Reiner O (2008) Accurate balance of the polarity kinase MARK2/Par-1 is required for proper cortical neuronal migration. *J Neurosci* 28: 5710-5720.
- Schaar BT, McConnell SK (2005) Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13652-13657.
- Shaheen R, Faqeh E, Ansari S, Alkuraya FS (2013) A truncating mutation in *B3GNT1* causes severe Walker-Warburg syndrome. *Neurogenetics*.
- Sharp DJ, Yu W, Ferhat L, Kuriyama R, Rueger DC, Baas PW (1997) Identification of a microtubule-associated motor protein essential for dendritic differentiation. *J Cell Biol* 138: 833-843.
- Sheen VL, Dixon PH, Fox JW, Hong SE, Kinton L, Sisodiya SM, Duncan JS, Dubeau F, Scheffer IE, Schachter SC, Wilner A, Henchy R, Crino P, Kamuro K, DiMario F, Berg M, Kuzniecky R, Cole AJ, Bromfield E, Biber M, Schomer D, Wheless J, Silver K, Mochida GH, Berkovic SF, Andermann F, Andermann E, Dobyns WB, Wood NW, Walsh CA (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.
- 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.
- Sherwin T, Schneider A, Sasse R, Seebeck T, Gull K (1987) Distinct localization and cell cycle dependence of COOH terminally tyrosinated alpha-tubulin in the microtubules of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol* 104: 439-446.
- Shi SH, Cheng T, Jan LY, Jan YN (2004) APC and GSK-3beta are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity. *Curr Biol* 14: 2025-2032.
- Shitamukai A, Konno D, Matsuzaki F (2011) Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer subventricular zone progenitors. *J Neurosci* 31: 3683-3695.
- Shu T, Ayala R, Nguyen MD, Xie Z, Gleeson JG, Tsai LH (2004) *Ndel1* operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning. *Neuron* 44: 263-277.
- Sidman RL, Miale IL, Feder N (1959) Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone: an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Exp Neurol* 1: 322-333.
- Sisodiya SM, Free SL, Williamson KA, Mitchell TN, Willis C, Stevens JM, Kendall BE, Shorvon SD, Hanson IM, Moore AT, van Heyningen V (2001) *PAX6* haploinsufficiency causes cerebral malformation and olfactory dysfunction in humans. *Nat Genet* 28: 214-216.
- Smart IH (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 IH, Dehay C, Giroud P, Berland M, Kennedy H (2002) Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. *Cereb Cortex* 12: 37-53.
- Soda T, Nakashima R, Watanabe D, Nakajima K, Pastan I, Nakanishi S (2003) Segregation and coactivation of developing neocortical layer 1 neurons. *J Neurosci* 23: 6272-6279.
- Soriano E, Alvarado-Mallart RM, Dumesnil N, Del Rio JA, Sotelo C (1997) Cajal-Retzius cells regulate the radial glia phenotype in the adult and developing cerebellum and alter granule cell migration. *Neuron* 18: 563-577.

- Sperber BR, Leight S, Goedert M, Lee VM (1995) Glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylates tau protein at multiple sites in intact cells. *Neurosci Lett* 197: 149-153.
- Stahl R, Walcher T, De Juan Romero C, Pilz GA, Cappello S, Irmeler M, Sanz-Aguela JM, Beckers J, Blum R, Borrell V, Gotz M (2013) *Trnp1* regulates expansion and folding of the mammalian cerebral cortex by control of radial glial fate. *Cell* 153: 535-549.
- Stepp ML, Cason AL, Finnis M, Mangelsdorf M, Holinski-Feder E, Macgregor D, MacMillan A, Holden JJ, Gecz J, Stevenson RE, Schwartz CE (2005) XLMR in MRX families 29, 32, 33 and 38 results from the dup24 mutation in the ARX (Aristaless related homeobox) gene. *BMC Med Genet* 6: 16.
- Stevens E, Carss KJ, Cirak S, Foley AR, Torelli S, Willer T, Tambunan DE, Yau S, Brodd L, Sewry CA, Feng L, Haliloglu G, Orhan D, Dobyns WB, Enns GM, Manning M, Krause A, Salih MA, Walsh CA, Hurles M, Campbell KP, Manzini MC, Stemple D, Lin YY, Muntoni F (2013) Mutations in *B3GALNT2* cause congenital muscular dystrophy and hypoglycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet* 92: 354-365.
- Stottmann RW, Donlin M, Hafner A, Bernard A, Sinclair DA, Beier DR (2013) A mutation in *Tubb2b*, a human polymicrogyria gene, leads to lethality and abnormal cortical development in the mouse. *Hum Mol Genet*.
- Stoykova A, Hatano O, Gruss P, Gotz M (2003) Increase in reelin-positive cells in the marginal zone of Pax6 mutant mouse cortex. *Cereb Cortex* 13: 560-571.
- Sussel L, Marin O, Kimura S, Rubenstein JL (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.
- Szyk A, Deaconescu AM, Piszczek G, Roll-Mecak A (2011) Tubulin tyrosine ligase structure reveals adaptation of an ancient fold to bind and modify tubulin. *Nat Struct Mol Biol* 18: 1250-1258.
- Tabata H, Nakajima K (2001) Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: visualization of neuronal migration in the developing cortex. *Neuroscience* 103: 865-872.
- Tabata H, Nakajima K (2003) Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 23: 9996-10001.
- Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr. (1995a) The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *J Neurosci* 15: 6046-6057.
- Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr. (1995b) Early ontogeny of the secondary proliferative population of the embryonic murine cerebral wall. *J Neurosci* 15: 6058-6068.
- Takeda S, Kondo M, Sasaki J, Kurahashi H, Kano H, Arai K, Misaki K, Fukui T, Kobayashi K, Tachikawa M, Imamura M, Nakamura Y, Shimizu T, Murakami T, Sunada Y, Fujikado T, Matsumura K, Terashima T, Toda T (2003) Fukutin is required for maintenance of muscle integrity, cortical histiogenesis and normal eye development. *Hum Mol Genet* 12: 1449-1459.
- Takei Y, Teng J, Harada A, Hirokawa N (2000) Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *J Cell Biol* 150: 989-1000.
- Tanaka T, Serneo FF, Tseng HC, Kulkarni AB, Tsai LH, Gleeson JG (2004) Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron* 41: 215-227.
- Tanyalcin I, Verhelst H, Halley DJ, Vanderhasselt T, Villard L, Goizet C, Lissens W, Mancini GM, Jansen AC (2013) Elaborating the phenotypic spectrum associated with mutations in *ARFGEF2*: Case study and literature review. *Eur J Paediatr Neurol*.
- The Boulder Committee (1970) Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. The Boulder Committee. *Anat Rec* 166: 257-261.
- Tischfield MA, Baris HN, Wu C, Rudolph G, Van Maldergem L, He W, Chan WM, Andrews C, Demer JL, Robertson RL, Mackey DA, Ruddle JB, Bird TD, Gottlob I, Pieh C, Traboulsi EI, Pomeroy SL, Hunter DG, Soul JS, Newlin A, Sabol LJ, Doherty EJ, de Uzategui CE, de Uzategui N, Collins ML, Sener EC, Wabbels B, Hellebrand H, Meitinger T, de Berardinis T, Magli A, Schiavi C, Pastore-Trossello M, Koc F, Wong AM, Levin AV, Geraghty MT, Descartes M, Flaherty M, Jamieson RV, Moller HU, Meuthen I, Callen DF, Kerwin J, Lindsay S, Meindl A, Gupta ML, Jr., Pellman D, Engle EC (2010) Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance. *Cell* 140: 74-87.
- Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA, Herz J (1999) Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 97: 689-701.
- Tsai JW, Bremner KH, Vallee RB (2007) Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue. *Nat Neurosci* 10: 970-979.

- Tsai JW, Chen Y, Kriegstein AR, Vallee RB (2005) LIS1 RNA interference blocks neural stem cell division, morphogenesis, and motility at multiple stages. *J Cell Biol* 170: 935-945.
- Valcanis H, Tan SS (2003) Layer specification of transplanted interneurons in developing mouse neocortex. *J Neurosci* 23: 5113-5122.
- van Reeuwijk J, Janssen M, van den Elzen C, Beltran-Valero de Bernabe D, Sabatelli P, Merlini L, Boon M, Scheffer H, Brockington M, Muntoni F, Huynen MA, Verrips A, Walsh CA, Barth PG, Brunner HG, van Bokhoven H (2005) POMT2 mutations cause alpha-dystroglycan hypoglycosylation and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet* 42: 907-912.
- Verhey KJ, Gaertig J (2007) The tubulin code. *Cell Cycle* 6: 2152-2160.
- Villard L, Nguyen K, Cardoso C, Martin CL, Weiss AM, Sifry-Platt M, Grix AW, Graham JM, Jr., Winter RM, Leventer RJ, Dobyns WB (2002) A locus for bilateral perisylvian polymicrogyria maps to Xq28. *Am J Hum Genet* 70: 1003-1008.
- Vuillaumier-Barrot S, Bouchet-Seraphin C, Chelbi M, Devisme L, Quentin S, Gazal S, Laquerriere A, Fallet-Bianco C, Loget P, Odent S, Carles D, Bazin A, Aziza J, Clemenson A, Guimiot F, Bonniere M, Monnot S, Bole-Feysot C, Bernard JP, Loeuillet L, Gonzales M, Socha K, Grandchamp B, Attie-Bitach T, Encha-Razavi F, Seta N (2012) Identification of mutations in TMEM5 and ISPD as a cause of severe cobblestone lissencephaly. *Am J Hum Genet* 91: 1135-1143.
- Walker TL, Yasuda T, Adams DJ, Bartlett PF (2007) The doublecortin-expressing population in the developing and adult brain contains multipotential precursors in addition to neuronal-lineage cells. *J Neurosci* 27: 3734-3742.
- Wang X, Tsai JW, LaMonica B, Kriegstein AR (2011) A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. *Nat Neurosci* 14: 555-561.
- Wang Z, Sheetz MP (2000) The C-terminus of tubulin increases cytoplasmic dynein and kinesin processivity. *Biophys J* 78: 1955-1964.
- Webster DR, Borisy GG (1989) Microtubules are acetylated in domains that turn over slowly. *J Cell Sci* 92 ( Pt 1): 57-65.
- Webster DR, Gundersen GG, Bulinski JC, Borisy GG (1987) Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 9040-9044.
- Willer T, Lee H, Lommel M, Yoshida-Moriguchi T, de Bernabe DB, Venzke D, Cirak S, Schachter H, Vajsar J, Voit T, Muntoni F, Loder AS, Dobyns WB, Winder TL, Strahl S, Mathews KD, Nelson SF, Moore SA, Campbell KP (2012) ISPD loss-of-function mutations disrupt dystroglycan O-mannosylation and cause Walker-Warburg syndrome. *Nat Genet* 44: 575-580.
- Willer T, Prados B, Falcon-Perez JM, Renner-Muller I, Przemeck GK, Lommel M, Coloma A, Valero MC, de Angelis MH, Tanner W, Wolf E, Strahl S, Cruces J (2004) Targeted disruption of the Walker-Warburg syndrome gene *Pomt1* in mouse results in embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14126-14131.
- Witte H, Neukirchen D, Bradke F (2008) Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol* 180: 619-632.
- Wright KM, Lyon KA, Leung H, Leahy DJ, Ma L, Ginty DD (2012) Dystroglycan organizes axon guidance cue localization and axonal pathfinding. *Neuron* 76: 931-944.
- Yoshida A, Kobayashi K, Manya H, Taniguchi K, Kano H, Mizuno M, Inazu T, Mitsuhashi H, Takahashi S, Takeuchi M, Herrmann R, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Toda T, Endo T (2001) Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* 1: 717-724.
- 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.
- Yu TW, Mochida GH, Tischfield DJ, Sgaier SK, Flores-Sarnat L, Sergi CM, Topcu M, McDonald MT, Barry BJ, Felie JM, Sunu C, Dobyns WB, Folkert RD, Barkovich AJ, Walsh CA (2010) Mutations in WDR62, encoding a centrosome-associated protein, cause microcephaly with simplified gyri and abnormal cortical architecture. *Nat Genet* 42: 1015-1020.
- Yu W, Qiang L, Solowska JM, Karabay A, Korulu S, Baas PW (2008) The microtubule-severing proteins spastin and katanin participate differently in the formation of axonal branches. *Mol Biol Cell* 19: 1485-1498.
- Yu W, Schwei MJ, Baas PW (1996) Microtubule transport and assembly during axon growth. *J Cell Biol* 133: 151-157.
- Yuasa-Kawada J, Suzuki R, Kano F, Ohkawara T, Murata M, Noda M (2003) Axonal morphogenesis controlled by antagonistic roles of two CRMP subtypes in microtubule organization. *Eur J Neurosci* 17: 2329-2343.

- Yuba-Kubo A, Kubo A, Hata M, Tsukita S (2005) Gene knockout analysis of two gamma-tubulin isoforms in mice. *Dev Biol* 282: 361-373.
- Zanni G, Colafati GS, Barresi S, Randisi F, Talamanca LF, Genovese E, Bellacchio E, Bartuli A, Bernardi B, Bertini E (2013) Description of a novel TUBA1A mutation in Arg-390 associated with asymmetrical polymicrogyria and mid-hindbrain dysgenesis. *Eur J Paediatr Neurol* 17: 361-365.
- Zecevic N, Chen Y, Filipovic R (2005) Contributions of cortical subventricular zone to the development of the human cerebral cortex. *J Comp Neurol* 491: 109-122.
- Zhang J, Neal J, Lian G, Shi B, Ferland RJ, Sheen V (2012) Brefeldin A-inhibited guanine exchange factor 2 regulates filamin A phosphorylation and neuronal migration. *J Neurosci* 32: 12619-12629.
- Zimmer C, Tiveron MC, Bodmer R, Cremer H (2004) Dynamics of Cux2 expression suggests that an early pool of SVZ precursors is fated to become upper cortical layer neurons. *Cereb Cortex* 14: 1408-1420.