



**HAL**  
open science

# Etude de l'influence de la topographie du microenvironnement sur la migration des interneurones corticaux par l'utilisation de substrats microstructurés

Claire Leclech

## ► To cite this version:

Claire Leclech. Etude de l'influence de la topographie du microenvironnement sur la migration des interneurones corticaux par l'utilisation de substrats microstructurés. Biophysique. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS245 . tel-02387369

**HAL Id: tel-02387369**

**<https://theses.hal.science/tel-02387369>**

Submitted on 29 Nov 2019

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

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



Sorbonne Université

Ecole doctorale : ED3C (Cerveau, Cognition, Comportement)

Programme doctoral : Interfaces Pour le Vivant

---

Etude de l'influence de la topographie du  
microenvironnement sur la migration des interneurons  
corticaux par l'utilisation de substrats microstructurés

---

Par **Claire Leclech**

Thèse de doctorat de biologie et biophysique

Dirigée par Christine Métin et Catherine Villard

Présentée et soutenue publiquement le 17 septembre 2018

Devant un jury composé de :

Mme Christine Métin (Directeur de Recherche)	Directeur de thèse
Mme Catherine Villard (Directeur de Recherche)	Directeur de thèse
Mr Matthieu Piel (Directeur de Recherche)	Rapporteur
Mr Vincent Studer (Chargé de Recherche, HDR)	Rapporteur
Mr Alexandre Baffet (Chargé de Recherche)	Examineur
Mme Karine Loulier (Chargé de Recherche)	Examineur
Mr René-Marc Mège (Directeur de Recherche)	Examineur
Mme Isabelle Dusart (Directeur de Recherche)	Président



*A mon grand-père*

*De tous, celui qui y croyait le plus.*



---

# Remerciements

---

Je tiens pour commencer à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Merci ensuite à mes deux directrices de thèse de m'avoir accueillie dans leurs laboratoires et d'avoir permis, chacune à leur manière, la réalisation de cette thèse.

Une co-direction, c'est un peu comme une famille recomposée, avec deux fois plus d'amis, de conseils et de soutien...

Du côté du Fer à Moulin, je veux commencer par remercier Maria, qui m'a accompagnée, ou devrais-je dire portée (et supportée !), pendant la première moitié de ma thèse, et sans qui je ne serais certainement pas là aujourd'hui. Mille mercis amiga !

Pour la seconde partie de ces quatre années, j'ai pu heureusement compter sur la team Delphine, Giorgia, Valentina, avec qui je ne compte même plus les déjeuners, les rires, les larmes, les jap', les expéditions Truffaut. Merci de tout cœur les filles !

Merci à toute l'équipe Métin/Gaspar, passée et présente, pour leur présence bienveillante pendant ces quatre années. Je pense en particulier à Aude, pour les sourires, la bonne humeur et surtout les activités manuelles ! Je pense aussi à Sophie, qui a toujours eu de très bonnes histoires pour me distraire le matin, ou autour d'un café. Merci aussi à Mariano pour les nombreuses discussions, à Jimmy pour les pauses café d'été, et au reste de l'équipe (dans le désordre) : Alex, Christine L, Anne, Teng, Patricia...

Et enfin, merci à l'ensemble de l'Institut du Fer à Moulin, qui est décidément un endroit pas comme les autres. Merci à Jean-Antoine, merci au secrétariat Jocelyne, Isabelle, Christine, merci à Géraldine et Mythili pour leur gentillesse. J'ai également une pensée particulière pour LA team événementielle de l'IFM : Nico, Sophie, Mélanie, Benoît, Ferran... Merci pour les karaokés, la chasse aux trésors, les lancers de cônes, et j'en passe. De manière générale, un grand merci à l'ensemble des personnes avec lesquelles j'ai pu discuter et échanger au cours de ces quatre années. Je garde un souvenir ému de cet Institut dans lequel j'ai passé de si bons (et si durs !) moments. Vous allez tous beaucoup me manquer.

Du côté de l'Institut Curie/IPGG, merci à l'ensemble de l'équipe Viovyz de m'avoir accueillie aussi gentiment malgré ma présence... disons... inconstante 😊 Merci à Jean-Louis, et merci à Stéphanie. Je remercie en particulier mes « co-thésards » Lucile, Lauriane, et en particulier Charles et Ismail pour avoir défendu aussi férocement mon bureau toutes ces années (hum hum). J'ai également une pensée affectueuse pour les « anciens » Marine, Bastien, Davide, Ivan.... Merci à tous pour ces bons moments, scientifiques ou non !

Je voulais aussi remercier ici mes ami(e)s de la Cité des Sciences avec qui j'ai adoré travailler (et randonner !), et qui ont illuminé ma troisième année de thèse : Marlène ma tutrice préférée, Valérie, Graziela, Fawzila, et tous les autres.

On le sait, la thèse ça a tendance à déborder du cadre professionnel, alors je tiens également à remercier tous ceux qui, hors du laboratoire, m'ont accompagnée pendant ces quatre années.

Je commence évidemment par mes parents, qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de me porter, dans cette aventure et dans tout le reste. Merci à ma maman en particulier pour le standard téléphonique SOS doctorant en détresse, et pour la relecture attentive de cette thèse.

Je continue par celle qui a peut-être le plus souffert avec moi pendant quatre ans (et tellement plus !), au cœur de l'action j'ai nommé l'autre Claire. Merci pour tout.

Merci à Pierre qui a courageusement repris le flambeau. Ton soutien, de près ou de loin, par lettres, ou téléphone satellite a été et restera précieux. J'en profite pour remercier l'ensemble de ma deuxième famille, Christine, Roger et tous les « Noug » et « Chaps », notamment pour m'avoir accueillie à l'île de Batz qui a vu naître ce manuscrit !

Merci à mes cousins, JF, MI, EA et PA, qui m'ont si souvent accueillie, à Rouen ou à Meudon, dans mes moments de joie ou de détresse.

Merci enfin à tous mes amis, scientifiques ou non, pour avoir patiemment écouté mes histoires de thèse, ou simplement d'avoir été là. J'ai une pensée particulière pour Arnaud, Maïlys et Anna qui ont été là dans les moments difficiles.

Je voudrais finir ces remerciements par une mention spéciale à ces choses qu'on dirait insignifiantes mais sans qui cette thèse aurait été beaucoup plus fade, j'ai nommé mon ami Picard, ses plats préparés à 2 euros et surtout son moelleux au chocolat. Merci. Merci également à la ciabatta de la boulangerie des chinois qui n'en est plus une, et au menu F6 du japonais (qui sont eux sûrement chinois). Enfin, une pensée émue pour mes poissons, et mon jardin du bureau du deuxième.

---

# Table des matières

---

Table des figures.....	V
Table des abréviations.....	VII
Résumés.....	IX
Avant-propos.....	XI

## I. Introduction

---

1. La migration cellulaire	1
<b>1.1 Une grande variété de migrations</b>	<b>2</b>
1.1.1 La migration cellulaire dans les processus physiologiques et pathologiques .....	2
1.1.2 Les différents modes de migration .....	2
<b>1.2 Mécanismes généraux de motilité</b>	<b>5</b>
1.2.1 Le cycle de migration.....	5
1.2.2 Mécanismes intracellulaires impliqués .....	6
1.2.2.1 Actine et génération de protrusions.....	6
1.2.2.2 Adhésion au substrat .....	9
1.2.2.3 Implication du réseau de microtubules.....	12
<b>1.3 La migration dirigée</b>	<b>14</b>
1.3.1 Polarisation cellulaire .....	15
1.3.2 Chimiotaxie .....	18
2. L'influence du microenvironnement sur la migration cellulaire	19
<b>2.1 Propriétés des environnements cellulaires</b>	<b>20</b>
2.1.1 Plasticité des modes de migration .....	20
2.1.2 Complexité des environnements cellulaires .....	21
<b>2.2 Influence de différents paramètres physiques sur la migration cellulaire</b>	<b>24</b>
2.2.1 Géométrie de l'environnement adhésif et architecture cellulaire.....	24
2.2.2 Migration sous confinement en 3D.....	27
2.2.3 Influence de la rigidité du substrat sur la migration .....	29
<b>2.3 Topographie et guidage par contact</b>	<b>32</b>
2.3.1 Effet de la topographie sur l'adhésion cellulaire .....	34
2.3.2 Effet de la topographie sur la morphologie et l'alignement cellulaire .....	34
2.3.3 Effet de la topographie sur la migration cellulaire .....	36

2.3.4	Mécanismes intracellulaires impliqués .....	39
2.3.5	Effet de la topographie sur le guidage axonal .....	42
<b>2.4</b>	<b>Compétition et intégration de différents signaux extracellulaires</b>	<b>45</b>
<b>3.</b>	<b>La migration neuronale pendant le développement du cerveau</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>La migration cellulaire pendant le développement du système nerveux</b>	<b>50</b>
3.1.1	Généralités sur le cerveau et son développement .....	50
3.1.2	Place de la migration dans le développement du cerveau .....	51
3.1.3	Le cortex cérébral .....	53
<b>3.2</b>	<b>La migration radiale des neurones excitateurs du cortex</b>	<b>57</b>
<b>3.3</b>	<b>La migration tangentielle des interneurons corticaux</b>	<b>60</b>
3.3.1	Génération et spécification des interneurons dans les éminences ganglionnaires ..	60
3.3.2	Migration des interneurons jusqu'au cortex .....	64
3.3.3	Positionnement final et mise en place des circuits corticaux .....	66
<b>3.4</b>	<b>Pathologies associées à des défauts de migration des interneurons corticaux</b>	<b>68</b>
<b>4.</b>	<b>Navigation et guidage des interneurons corticaux</b>	<b>71</b>
<b>4.1</b>	<b>Mécanismes intrinsèques cellulaires et moléculaires</b>	<b>72</b>
4.1.1	Branchement du prolongement de migration .....	72
4.1.2	La nucléokinèse : un mouvement saltatoire du noyau .....	77
4.1.3	Mouvements coordonnés et cycle de migration .....	80
<b>4.2</b>	<b>Guidage extracellulaire de la migration</b>	<b>81</b>
4.2.1	Sortie des zones prolifératives et initiation de la migration .....	81
4.2.2	Migration vers le cortex à travers le subpallium .....	82
4.2.3	Organisation et sélection des voies de migration dans le cortex .....	84
4.2.4	Réorientation et dispersion dans le cortex .....	85
4.2.5	Arrêt de la migration .....	88
<b>4.3</b>	<b>Environnement extracellulaire de migration</b>	<b>88</b>
4.3.1	Substrat de migration et rôle des molécules d'adhésion .....	88
4.3.2	Propriétés physiques de l'environnement extracellulaire .....	90
<b>5.</b>	<b>Objectifs</b>	<b>93</b>

## II. Résultats

---

1. Article 1 : Control of cortical interneurons morphology and migration by topographical cues	99
2. Résultats complémentaires	135
<b>2.1 Mise au point du système expérimental</b>	<b>137</b>
2.1.1 Développement d'un protocole de fabrication de substrats microstructurés pour la culture primaire d'interneurones en migration.....	137
2.1.1.1 Fabrication du moule original par photolithographie .....	137
2.1.1.2 Fabrication de la lamelle finale par moulages de PDMS .....	139
2.1.1.3 Fonctionnalisation de la surface par dépôt de molécules d'adhésion .....	140
2.1.1.4 Culture primaire d'interneurones en migration .....	142
2.1.2 Test et choix du type de géométrie de topographie .....	143
2.1.3 Test et choix du type de molécules d'adhésion.....	146
2.1.3.1 Premiers tests de substrats mixtes N-cadhérine et laminine sur du verre .....	146
2.1.3.2 Influence des molécules d'adhésion sur les substrats microstructurés.....	148
2.1.4 Caractérisation cellulaire des cultures .....	150
2.1.5 Organisation macroscopique et variabilité au sein des cultures .....	152
<b>2.2 Caractérisation intracellulaire approfondie des interneurones en migration sur les deux substrats de plots</b>	<b>154</b>
2.2.1 Position du centrosome dans les interneurones en migration .....	154
2.2.2 Organisation des adhésions focales .....	156
2.2.3 Organisation des comètes EB1.....	158
2.2.4 Organisation de la tubuline acétylée .....	159
2.2.5 Organisation de la myosine IIB.....	160

## III. Discussion

---

1. Les approches biophysiques pour l'étude de la migration des interneurones corticaux	166
1.1 Intérêt des approches in vitro réductionnistes	166
1.2 Développement d'un nouveau système expérimental pour l'étude de la migration des interneurones in vitro	167
2. Caractérisation de différentes morphologies d'interneurones	168
2.1 La topographie sélectionne une partie du large spectre morphologique intrinsèque des interneurones	168

2.2 Ces différents états cellulaires sont caractérisés par une combinaison de paramètres morphologiques liés	169
2.2.1 Critères morphologiques.....	169
2.2.2 Influence réciproque de l'organisation morphologique sur la dynamique de branchement.....	170
3. Mise en évidence de différents comportements dynamiques	171
3.1 Lien entre morphologie et mode de migration	171
3.2 Le prolongement de migration, acteur de la migration neuronale	172
4. Le guidage par contact des interneurons corticaux	173
4.1 Un alignement remarquable entre les plots carrés	173
4.2 Modèle de la mise en place des différents états cellulaires observés	176
4.3 Mécanismes intracellulaires et moléculaires impliqués	177
4.4 La topographie : guide ou obstacle ?	178
5. Implication de ces résultats dans un cadre physiologique	179
5.1 Comportements dynamiques et stratégies de migration in vitro et in vivo	179
5.2 Influence des paramètres physiques de l'environnement in vivo ?	181
Conclusion	183
Travaux annexes	
Article 2.....	187
Article 3.....	189
Bibliographie	191
Annexes	
Annexe 1 : tableau effets de la topographie sur les comportements cellulaires.....	216
Annexe 2 : tableau effets de la topographie sur le guidage axonal .....	221

---

# Table des figures

---

## Introduction

Figure 1 | Diversité morphologique des cellules motiles

Figure 2 | Différents modes de migration

Figure 3 | Les étapes du cycle de migration

Figure 4 | L'actine et sa polymérisation sont impliqués dans l'extension de protrusions

Figure 5 | Adhésion au substrat et génération de forces

Figure 6 | Les microtubules dans la cellule en migration

Figure 7 | Principes de migration directionnelle et de polarisation cellulaire

Figure 8 | Déterminants de la migration et plasticité des modes de migration

Figure 9 | Diversité des environnements de migration dans l'organisme

Figure 10 | Contrôle expérimental de différents paramètres physiques du micro-environnement

Figure 11 | Influence de la géométrie des surfaces adhésives sur la polarisation et la migration cellulaire

Figure 12 | La migration cellulaire sous confinement

Figure 13 | Influence de la rigidité du substrat sur la migration cellulaire

Figure 14 | Topographie du microenvironnement *in vivo* et *in vitro*

Figure 15 | Réponses cellulaires à un micro-relief de tranchées

Figure 16 | Influence de la topographie sur la migration cellulaire et l'organisation du cytosquelette

Figure 17 | Influence de la topographie sur le guidage axonal

Figure 18 | Compétition de différents indices extracellulaires contradictoires

Figure 19 | Le développement du cerveau chez les vertébrés

Figure 20 | Place de la migration neuronale dans le développement du cerveau

Figure 21 | Une grande diversité d'interneurones corticaux

Figure 22 | Migration radiale des neurones excitateurs et formation des couches corticales

Figure 23 | Génération et spécification des interneurones corticaux dans les éminences ganglionnaires

Figure 24 | Voies de migration et mouvement des interneurones corticaux

Figure 25 | Branchement du prolongement de direction des interneurones corticaux

Figure 26 | Mouvements nucléaires pendant la migration des interneurones corticaux

Figure 27 | Cycle de migration des interneurones corticaux

Figure 28 | Guidage extrinsèque des interneurones corticaux

Figure 29 | Les interneurones ne montrent pas de substrat de migration préférentiel

Figure 30 | Les différentes couches corticales montrent des rigidités différentes et variables au cours du développement

## Résultats

Figure 31 | Etapes du protocole de fabrication des lamelles microstructurées

Figure 32 | Etapes de la dissection des explants d'EGM d'embryons de souris

Figure 33 | Test de différentes géométries de topographie

Figure 34 | Influence des combinaisons de molécules d'adhésion sur la migration et la morphologie des interneurones

Figure 35 | Influence des molécules d'adhésion et des différents substrats sur la migration des interneurones

Figure 36 | Caractérisation cellulaire des cultures

Figure 37 | Organisation macroscopique et variabilité des cultures

Figure 38 | Positionnement du centrosome dans les interneurones en migration

Figure 39 | Adhésions focales dans les interneurones en migration entre des plots carrés

Figure 40 | Distribution des comètes EB1 dans les interneurones en migration

Figure 41 | Organisation de la tubuline acétylée dans les interneurones en migration

Figure 42 | Distribution de la myosine2B dans les interneurones en migration

## Discussion

Figure 43 | Modèle récapitulatif des différents états cellulaires ségrévés et de leur mise en place

---

## Table des abréviations

---

<b>RMS</b>	Radial Migratory Stream	<b>VIP</b>	Vaso-Intestinal Peptide
<b>ADP</b>	Adenosine Di Phosphate	<b>SST</b>	Somatostatine
<b>Arp</b>	Actin Related Protein	<b>NPY</b>	Neuro-Peptide Y
<b>ADF</b>	Actin Depolymerizing Factor	<b>PV</b>	Parvalbumine
<b>Rac1</b>	Ras-related C3 botulinum toxin substrate	<b>CR</b>	Calrétinine
<b>Cdc42</b>	Cell division control protein 42	<b>CB</b>	Calbindine
<b>MAP</b>	Microtubules Associated Protein	<b>ZV</b>	Zone Ventriculaire
<b>MT</b>	Microtubules	<b>ZSV</b>	Zone Sous Ventriculaire
<b>Par</b>	Polarity protein partitioning-defective	<b>PC</b>	Plaque Corticale
<b>PIP3</b>	Phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate	<b>ZM</b>	Zone Marginale
<b>PTEN</b>	Phosphatase and tensin homolog	<b>SP</b>	Sous Plaque
<b>FRET</b>	Forster Resonance Energy Transfer	<b>ZI</b>	Zone Intermédiaire
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein	<b>PP</b>	Pré-plaque
<b>PDMS</b>	Polydiméthylsiloxane	<b>EG</b>	Eminences ganglionnaires
<b>LINC</b>	Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton	<b>EGM</b>	Eminence ganglionnaire médiane
<b>MEB</b>	Microscopie Electronique à Balayage	<b>EGC</b>	Eminence ganglionnaire caudale
<b>FAK</b>	Focal Adhesion Kinase	<b>EGL</b>	Eminence ganglionnaire latérale
<b>RACK</b>	Receptor of activated protein kinase C	<b>APO</b>	Aire préoptique
<b>YAP</b>	Yes-associated protein	<b>Shh</b>	Sonic Hedgehog
<b>TAZ</b>	Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif	<b>Str</b>	Striatum
<b>NGF</b>	Neural Growth Factor	<b>Nrg</b>	Neuréguline
<b>NP</b>	Neural Plate	<b>ROCK</b>	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase ou Rho kinase.
<b>NT</b>	Neural Tube	<b>DCX</b>	Doublecortine
<b>PA</b>	Progéniteurs Apicaux	<b>HGF</b>	Hepatocyte Growth Factor
<b>PI</b>	Progéniteurs Intermédiaires	<b>BDNF</b>	Brain Derived Neurotrophic Factor
<b>GABA</b>	Acide $\gamma$ -aminobutyrique	<b>NT4</b>	Neurotrophine 4
		<b>GDNF</b>	Glial Derived Neurotrophic Factor

<b>PIP3</b>	Phosphatidylinositol (3, 4 5) Triphosphate
<b>ATK</b>	Protein Kinase B
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated protein kinase
<b>Nrp1</b>	Neuropilin 1
<b>AF</b>	Adhésions focales
<b>GlyR</b>	Recepteur à la glycine
<b>KCC2</b>	Potassium-chloride co-transporter
<b>EB1</b>	End Binding-1

---

## Résumé

---

Dans le cerveau en développement, les interneurones corticaux effectuent une longue migration avant de se positionner dans le cortex et s'intégrer dans les réseaux corticaux dont ils régulent l'activité. Différents facteurs chimiques ont été impliqués dans le guidage de ces cellules, mais l'influence des propriétés physiques de l'environnement dans lequel ils naviguent reste peu connue. Il a été montré que les indices topographiques peuvent guider le mouvement de nombreux types cellulaires, un processus appelé guidage par contact. Mes travaux de thèse ont ainsi cherché à tester et comprendre l'influence de la topographie de l'environnement sur la migration des interneurones corticaux. En utilisant un système expérimental de substrats microstructurés, nous avons mis en évidence pour la première fois l'existence du guidage par contact pour ces cellules. En testant deux types de micro-plots, nous avons établi qu'un changement de forme des structures influence de manière importante l'orientation, la morphologie, l'organisation du cytosquelette et le comportement dynamique des cellules. En particulier, les interneurones en migration entre des plots carrés adoptent majoritairement une morphologie allongée et peu branchée, associée à un mouvement lent et dirigé. A l'inverse, des cellules entre des plots ronds sont plus courtes et montrent un branchement important associé à un mouvement dynamique mais aléatoire. Plus généralement, nous montrons *in vitro* que la topographie génère des contraintes spatiales globales qui promeuvent la mise en place de différents états cellulaires morphologiques et dynamiques, soulignant ainsi la potentielle importance de ce type d'indices *in vivo*.

**Mots-clés :** *interneurones corticaux ; migration cellulaire ; micro-environnement ; topographie ; guidage par contact ; substrats microstructurés*

---

## Abstract

---

In the developing brain, cortical interneurons undergo a long distance migration to reach the cortex where they integrate into cortical networks and regulate their activity in the adult. Different chemical factors have been involved in the guidance of these cells, but the influence of the physical parameters of the environment in which they navigate remains unclear. It has been shown that topographical cues are able to influence and guide the migration of several cell types, a process called contact guidance. This work therefore aimed at testing and understanding the influence of the topography of the environment in the migration of cortical interneurons. By using an experimental system of microstructured substrates, we demonstrated for the first time the existence of contact guidance for these cells. By testing two types of micron-sized pillars, we showed that a change in the shape of the structures could greatly impact cell orientation, morphology, cytoskeleton organization and dynamic behavior. In particular, most interneurons migrating in between square pillars adopt an elongated, unbranched morphology associated with a slow and directed movement, whereas the majority of cells among round pillars exhibit a short and branched morphology associated with a dynamic but wandering movement. Overall, we show that micron-sized topography provides global spatial constraints promoting the establishment of different morphological and migratory states *in vitro*, highlighting the potential importance of these types of cues *in vivo*.

---

## Avant-propos

---

En 2015, le journal *Nature* publie un numéro intitulé « Interdisciplinarité : pourquoi les scientifiques doivent s'unir pour sauver le monde ». Même si le terme « interdisciplinary » n'apparaît qu'en 1937 dans l'*Oxford English Dictionary*, on retrouve cette notion et l'idée d'une science unifiée, d'un savoir général et intégré depuis la Grèce antique, où les historiens et dramaturges s'approprièrent des éléments venus de la médecine ou de la philosophie par exemple. Paradoxalement, c'est également de l'époque de Platon et Aristote que remonte l'idée de diviser le savoir académique en catégories discrètes, une fragmentation que regrettent des philosophes du XVI<sup>e</sup> siècle comme Francis Bacon. La croissance rapide de la Science et les nombreuses connaissances générées, en particulier à partir du XVIII<sup>e</sup> siècle ont poussé à la classification et ainsi à la création de nombreuses disciplines et sous-disciplines. La biologie a été par exemple divisée en botanique et zoologie, puis en biologie de l'évolution, biologie moléculaire, microbiologie, biochimie, biophysique, bioingénierie, etc. En 2016, on comptait ainsi presque 40 départements de biologie différents à l'université du Michigan.

L'élan de décloisonnement des disciplines que l'on voit aujourd'hui se développer prend ses racines dans les travaux de différents scientifiques, depuis Claude Bernard (1813-1878) et ses successeurs en passant par Richard Francis Burton (1821-1890), polymathe britannique ou d'Arcy Thompson (1860-1948), homme de lettres, zoologiste et mathématicien écossais qui, dans son ouvrage « *On growth and form* » (1917), pose déjà comme une nécessité l'apport des mathématiques et de la physique pour le développement des sciences biologiques. Si la physique et les mathématiques ont permis de faire progresser la physiologie, la génétique ou la théorie de l'évolution dès la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, il a fallu attendre la deuxième moitié du XX<sup>e</sup> siècle pour voir se développer la biophysique à l'échelle cellulaire et moléculaire grâce notamment au développement de nouvelles techniques de microscopie et microfabrication. L'essor actuel de disciplines comme la biophysique, les biomathématiques ou la bioinformatique montre combien les frontières entre la biologie et les autres sciences s'estompent ; la biologie tire profit de ces interfaces thématiques mais elle irrigue également les autres sciences en retour.

Mes travaux de thèse, à l'interface entre la biologie et la physique, s'inscrivent dans cette démarche interdisciplinaire et illustrent cet adoucissement des frontières disciplinaires. Plutôt classés et orientés vers la biologie en raison ma formation initiale, mes travaux se nourrissent néanmoins d'approches et de concepts biophysiques qui pourront, je l'espère, intéresser un public non-biologiste. Au sein même de la communauté biologiste, mes travaux de recherche gravitent entre la biologie cellulaire, la neurobiologie et la biologie du développement. Libre à chacun donc d'en choisir la classification et le

prisme à travers lequel lire et interpréter cette étude.

Ce travail se centre sur la cellule, et cherche à comprendre la façon dont elle interagit avec son environnement. Ces interactions sont particulièrement cruciales et mises en valeur dans le cadre de la migration cellulaire, où les cellules ont besoin de créer des contacts physiques transitoires avec leur micro-environnement afin de générer des forces de traction ou de propulsion. Nous nous sommes intéressés ici aux neurones embryonnaires, des cellules à la morphologie et aux propriétés fascinantes, qui effectuent dans le cerveau en développement une migration cruciale pour le bon assemblage des circuits neuronaux adultes. **Mes travaux de thèse s'inscrivent en particulier dans un nouveau mode de conception des processus biologiques qui vise à démontrer et à comprendre l'influence des paramètres physiques et mécaniques de l'environnement sur les comportements cellulaires, et notamment au cours du développement du cerveau.**

La première partie de ce manuscrit est une synthèse bibliographique introduisant le contexte de mon travail. Pour commencer, j'aborderai de manière générale la migration cellulaire et les mécanismes de motilité associés (chapitre 1). Sera ensuite présentée de manière plus approfondie l'influence du micro-environnement et de quelques-unes de ses propriétés (adhésives, mécaniques ou topographiques) sur la migration cellulaire (chapitre 2). J'introduirai ensuite notre modèle d'étude : la migration neuronale pendant le développement du cerveau, et notamment celle des interneurons corticaux sur lesquels j'ai travaillé (chapitre 3), pour finir sur le guidage et la navigation de ces cellules dans le cerveau embryonnaire (chapitre 4).

**La question principale qui a mené mes travaux de recherche porte sur l'influence de la topographie du microenvironnement sur la migration des interneurons corticaux.** L'originalité de ce travail réside dans le caractère exploratoire et novateur de la question biologique et des approches expérimentales choisies pour y répondre. A ma connaissance, c'est ainsi la première fois que la migration des interneurons corticaux est testée et étudiée dans un environnement *in vitro* microstructuré, et que le phénomène de guidage par contact est mis en évidence pour ces cellules. L'ensemble des résultats obtenus pendant ma thèse sont présentés dans la seconde partie du manuscrit, elle-même divisée en deux chapitres : le premier présente l'article scientifique détaillant les résultats principaux de cette étude, et le second regroupe un ensemble de résultats complémentaires.

Si les résultats obtenus lors de ce travail sont principalement descriptifs, ils constituent une preuve de concept importante dans le domaine de la migration neuronale, et ouvrent des pistes de recherche très intéressantes et prometteuses pour le futur. Les concepts dégagés ici *in vitro* peuvent avoir d'importantes implications et répercussions sur la migration et le guidage des interneurons corticaux *in vivo*. L'ensemble de ces aspects sera finalement discuté dans la dernière partie de ce manuscrit.

# I. Introduction



**Sommaire**

---

**1.1 Une grande variété de migrations**

- 1.1.1 La migration cellulaire dans les processus physiologiques et pathologiques
- 1.1.2 Les différents modes de migration

**1.2 Mécanismes généraux de motilité**

- 1.2.1 Le cycle de migration
- 1.2.2 Mécanismes intracellulaires impliqués
  - 1.2.2.1 Actine et génération de protrusions
  - 1.2.2.2 Adhésion au substrat
  - 1.2.2.3 Implication du réseau de microtubules

**1.3 La migration dirigée**

- 1.3.1 Polarisation cellulaire
  - 1.3.2 Chimiotaxie
- 

La migration cellulaire étant au cœur de mes travaux de thèse, j'en présente dans ce chapitre les caractéristiques majeures et les mécanismes intracellulaires fondamentaux qui la conduisent.

## 1.1 Une grande variété de migrations

### 1.1.1 La migration cellulaire dans les processus physiologiques et pathologiques

La migration cellulaire est un processus expérimenté par toutes les cellules à un moment donné de leur vie. Au cours du développement, la migration cellulaire est cruciale pour construire l'organisme, les tissus et les organes. Dès le stade de la gastrulation, les mouvements cellulaires collectifs mettent en place les trois feuilletts embryonnaires. Plus tard, les cellules de crêtes neurales migrent massivement pour coloniser l'embryon et se différencier en neurones, cellules pigmentaires ou encore myoblastes.

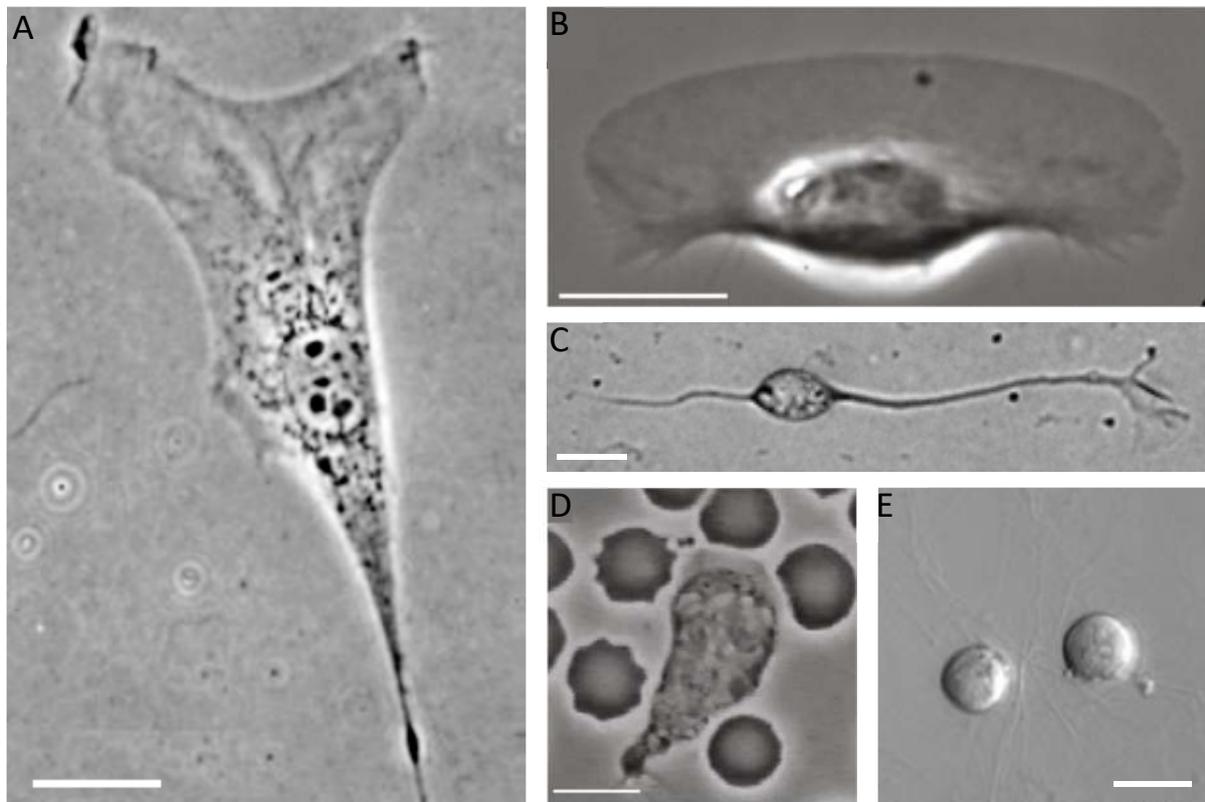
Pour la plupart des cellules constituant les organismes multicellulaires, les phases de migration restent confinées aux étapes de morphogenèse et cessent avec la différenciation terminale. Chez l'adulte néanmoins, la migration cellulaire reste essentielle pour maintenir l'intégrité de l'organisme, face à des infections ou lésions par exemple. Ainsi, lors d'une blessure, les fibroblastes dans l'épiderme migrent afin de refermer la lésion. Les cellules immunitaires comme les macrophages sont également recrutées et migrent sur le site de l'inflammation. A l'inverse, les cellules présentatrices d'antigènes se déplacent du site d'inflammation aux organes lymphoïdes pour activer les lymphocytes. La migration cellulaire est donc au cœur des processus immunitaires et pour ces cellules, le phénotype migratoire est inhérent à leur fonction et maintenu tout au long de leur vie.

La migration cellulaire et sa dérégulation sont également centrales dans de nombreuses pathologies. A toutes les étapes du développement et dans toutes les fonctions citées précédemment, un défaut de migration engendre des troubles sévères, allant de malformations létales jusqu'à un certain nombre de syndromes (troubles neurologiques, maladies cardiaques, retards physiques et mentaux, etc.). Dans les processus d'immunité, un défaut de migration peut entraîner des pathologies comme l'immunodépression, maladies auto-immunes ou inflammations chroniques. Chez l'adulte, la migration cellulaire peut être réactivée de manière anormale chez des cellules non motiles, comme des cellules épithéliales par exemple. Cette réactivation confère à ces cellules un phénotype invasif au cœur des processus tumoraux, et métastatiques en particulier (pour revues voir Friedl and Wolf, 2003; Kurosaka and Kashina, 2008).

### 1.1.2 Les différents modes de migration

La diversité des comportements migratoires peut être visualisée au travers de la diversité des formes adoptées par les cellules (Figure 1). Ces critères morphologiques furent utilisés à l'origine pour tenter

de classifier différents modes de migration. On y a ensuite intégré des paramètres supramoléculaires comme l'organisation du cytosquelette ou le type d'interaction avec la matrice extracellulaire.



**Figure 1 | Diversité morphologique des cellules motiles**

(A) Fibroblaste en migration. Echelle 20 $\mu$ m. (B) Kératocyte en migration. Echelle 10 $\mu$ m. (C) Interneurone cortical embryonnaire. Echelle 10 $\mu$ m (D) Neutrophile humain entouré de globules rouges chassant une bactérie. Echelle 10 $\mu$ m. (E) Cellules de sarcome. Echelle 50 $\mu$ m. Adapté de (Mogilner and Keren, 2009; Pankova et al., 2010) et données personnelles

Classiquement, on distingue la migration de groupes de cellules et la migration de cellules individuelles ou isolées, comprenant la migration amiboïde et mésenchymateuse. Ces deux modes de migration, individuel ou collectif, remplissent des fonctions différentes. La migration collective est indispensable pour construire et remodeler des tissus et organes comme les épithéliums, glandes ou vaisseaux. A l'inverse, la migration individuelle permet aux cellules de se déplacer localement pour s'intégrer dans un tissu par exemple (migration des crêtes neurales, ou processus de cicatrisation), ou au contraire de se déplacer plus largement d'un point à un autre dans l'organisme (cellules du système immunitaire).

La migration amiboïde, du terme grec *amoibê* (« échange »), est sans doute une des formes les plus primitives de migration cellulaire. Ce mouvement récapitule celui de l'amibe *Dictyostelium discoideum*, qui se déplace en alternant rapidement des cycles d'expansions et de contractions. Chez les eucaryotes supérieurs, la migration amiboïde est observée chez les cellules souches hématopoïétiques, les

leucocytes et certaines cellules tumorales par exemple. Ces cellules sont caractérisées par une forme arrondie, un mouvement « rampant » rapide et de faibles adhésions avec la matrice extracellulaire, dans laquelle elles sont capables de se faufiler en se déformant. La migration amiboïde est parfois subdivisée en migration dite « blebby » (formation de « bulles membranaires », observée chez les macrophages par exemple) et une migration amiboïde protrusive pseudopodiale (extensions membranaires) plus intermédiaire dans le spectre (observée chez les leucocytes par exemple) (Friedl and Wolf, 2003, 2010; Yoshida and Soldati, 2006) (Figure 2).

La migration mésenchymateuse est le mode de migration le plus commun, elle englobe un grand nombre de types cellulaires, dont les fibroblastes représentent l'exemple le plus classique. Ces cellules présentent en général une morphologie plus allongée et polarisée, établissent des adhésions avec leur substrat et migrent à des vitesses assez faibles. Une grande variabilité phénotypique, dépendante du contexte de migration, est observée au sein de cette catégorie (Figure 2).

La migration en chaîne, intermédiaire entre migration individuelle et collective, concerne les cellules qui suivent une voie commune de migration et y établissent transitoirement des contacts avec leurs voisines (Figure 2).

La migration collective est quant à elle caractérisée par le mouvement coordonné d'un ensemble de cellules maintenues entre elles par des jonctions intercellulaires. Les cellules se déplacent en une unité cohésive qui peut prendre des formes variées : monocouches ou multicouches en nappes ou colonnes en deux dimensions. En trois dimensions, les multicouches peuvent s'organiser de manière plus complexe, avec une lumière interne qui définit une polarité apico-basale lors de la formation de glandes par exemple. Une migration collective efficace implique une forte cohésion entre cellules, médiée par les jonctions adhérentes cellule-cellule. A l'avant, on distingue des cellules « meneuses » caractérisées par une forte activité protrusive et adhérente pour guider les cellules « suiveuses » en arrière. Cette organisation conduit à un mouvement coordonné et polarisé de l'ensemble des cellules (Friedl, 2004) (Figure 2). Par souci de simplification, on se focalisera pour la suite du propos sur la migration individuelle.

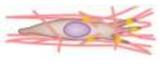
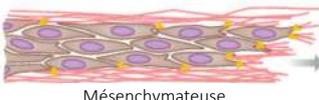
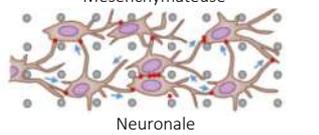
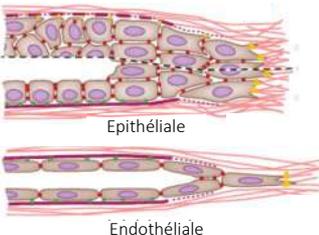
	Mode de migration	Types cellulaires	Caractéristiques cellulaires	
INDIVIDUEL		<b>Amiboïde blebby</b>	Macrophages, certaines cellules souche	Formation de « blebs », faible polarisation, faible vitesse (<math><1\mu\text{m}/\text{min}</math>)
		<b>Amiboïde protrusive</b>	Leukocytes, cellules dendritiques	Morphologie ronde, peu adhésive, vitesse rapide (10-20 $\mu\text{m}/\text{min}$ )
		<b>Mésenchymateuse</b>	Fibroblastes, cellules de crêtes neurales	Morphologie allongée et polarisée, adhésive, vitesse faible (0,1-1 $\mu\text{m}/\text{min}$ )
COLLECTIF	 Mésenchymateuse	<b>Migration en chaîne</b>	Neurones du RMS (radial migratory stream), Fibroblastes, cellules de crêtes neurales	Cellules individuelles avec des contacts intercellulaires ponctuels. Vitesses intermédiaires (4-8 $\mu\text{m}/\text{min}$ pour RMS)
	 Neuronale			
	 Epithéliale Endothéliale	<b>Migration collective</b>	Cellules épithéliales, cellules de la ligne latérale (zébrafish), cellules de bordure (follicule ovarien, drosophile)	Adhésions intercellulaires stables, communication intercellulaire et coordination multicellulaire

Figure 2 | Différents modes de migration

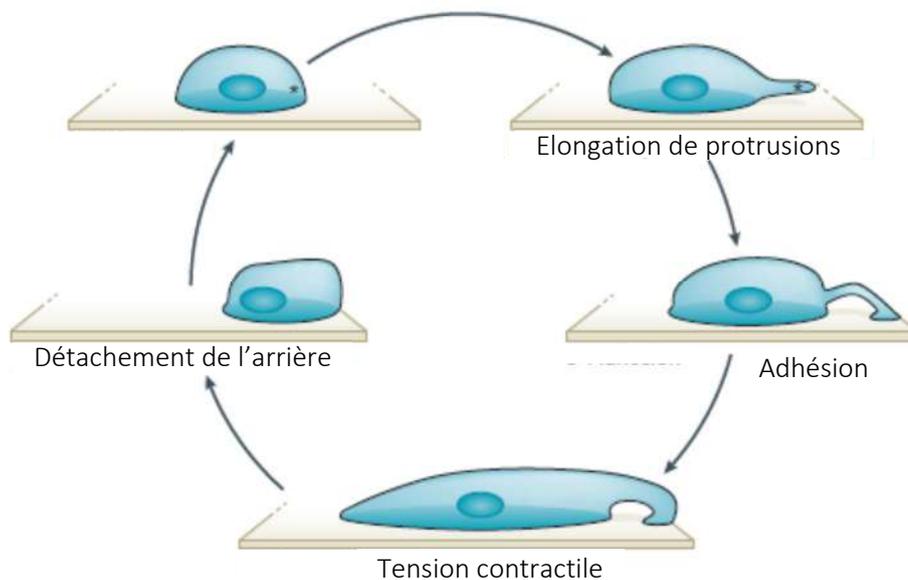
Adapté de (Te Boekhorst et al., 2016; Friedl and Wolf, 2010)

## 1.2 Mécanismes généraux de motilité

### 1.2.1 Le cycle de migration

L'observation de fibroblastes migrant en 2D a servi de base à la description de la migration mésenchymateuse et d'un cycle général de migration cellulaire découpé en quatre étapes : la protrusion, l'adhésion, la traction et la rétraction (Figure 3). La cellule coordonne et enchaîne ces différentes étapes de manière cyclique pour générer son mouvement. Le mouvement des cellules peut être ainsi comparé à celui d'un alpiniste sur une paroi : celui-ci étend le bras pour trouver une prise, s'y accroche et s'y appuie pour se hisser vers le haut, tout en lâchant les prises sur lesquelles il n'a plus d'appui.

Pour initier son mouvement, la cellule étend dans la direction du mouvement des protrusions contenant un réseau dense d'actine dont la polymérisation pousse la membrane plasmique vers l'avant. Dans un second temps, la protrusion adhère à la matrice extracellulaire en formant des adhésions naissantes qui mûrissent à l'arrière en adhésions focales. Ces adhésions, reliées au cytosquelette à l'intérieur de la cellule, lui permettent d'appliquer une force de traction sur le substrat et de générer un mouvement vers l'avant. Enfin, dans un dernier temps, les adhésions maintenant à l'arrière sont détachées et la membrane arrière rétractée pour permettre à la cellule de recommencer un nouveau cycle de migration et de continuer son mouvement (Lauffenburger and Horwitz, 1996; Ridley et al., 2003) (Figure 3).



### Figure 3 | Les étapes du cycle de migration

Un signal externe ou interne figuré par l'astérisque déclenche l'extension de protrusions. L'attachement de ces protrusions initie la formation de complexes d'adhésion reliés à la machinerie contractile. Les forces de contractions générées permettent le mouvement vers l'avant et le détachement de l'arrière de la cellule (Bravo-Cordero et al., 2013)

### 1.2.2 Mécanismes intracellulaires impliqués

Les mécanismes à la base de la motilité cellulaire sont pour la plupart ancestraux et impliquent des composants moléculaires conservés entre les protozoaires et les vertébrés, ce qui en fait remonter l'origine à plus d'un milliard d'années.

#### 1.2.2.1 Actine et génération de protrusions

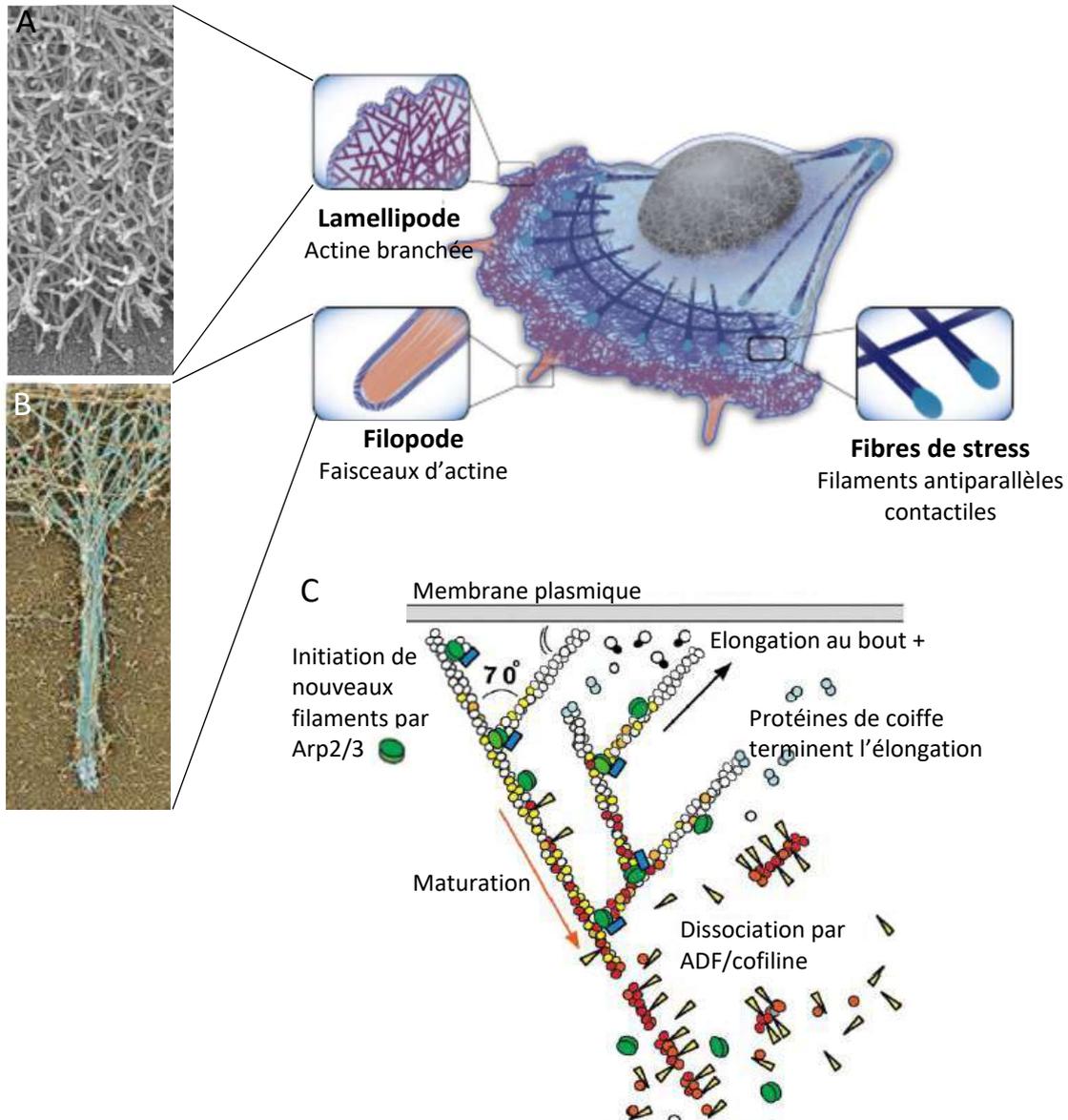
La cellule en migration étend à l'avant des protrusions qui peuvent présenter différentes morphologies : larges et aplaties (lamellipodes) ou allongées et pointues (filopodes). Les filopodes sont formés de

faisceaux parallèles d'actine et les lamellipodes d'un réseau branché d'actine (Svitkina and Borisy, 1999) (Figure 4A,B).

L'actine est une protéine globulaire (actine-G) monomérique de 42kDa qui se lie à l'ADP ou à l'ATP. *In vitro*, l'actine-G est capable de polymériser et de former un filament (actine-F) composé de deux hélices enroulées. Ce filament d'actine est polarisé : l'actine liée à l'ATP est polymérisée à l'extrémité plus (+) ou bout barbé et elle est dépolymérisée sous forme d'actine-ADP à l'extrémité moins (-) ou bout pointu. Ce mécanisme appelé « treadmilling » ou « tapis roulant » permet l'allongement des filaments d'actine depuis le bout plus et est à la base de la génération d'une force protrusive à l'avant de la cellule. En effet, les filaments d'actine sont orientés dans la cellule : les extrémités (+) rayonnent vers l'avant de la cellule et sont polymérisés vers la membrane plasmique tandis que les extrémités (-) dépolymérisent à l'arrière du lamellipode. Une question demeure : comment l'ajout de nouveaux monomères à un filament collé à la membrane peut avoir lieu ? En réalité, l'énergie thermique plie en permanence les filaments d'actine qui peuvent alors intégrer de nouveaux monomères et stocker de la force élastique. La détente du filament ainsi allongé génère une force de protrusion sur la membrane.

L'analyse *in vitro* de la biochimie de l'actine purifiée et de sa cinétique de polymérisation a montré que le phénomène de « treadmilling » est naturellement très lent et non compatible avec les vitesses de migration cellulaire observées. Par ailleurs, les filaments d'actine pure sont longs et flexibles et ne peuvent donc pas soutenir seuls une force protrusive. C'est pourquoi la cellule organise au niveau du lamellipode un réseau branché et dense qui implique un grand nombre de protéines associées à l'actine (Pollard and Borisy, 2003).

Le complexe Arp2/3 crée des sites de branchement sur les filaments d'actine et permet l'allongement de nouveaux filaments au plus proche de la membrane plasmique. Arp2/3, associé à d'autres protéines comme les filamines, permet également de réticuler et donc stabiliser le réseau d'actine et les protrusions. Ainsi, les cellules sans filamine ont un lamellipode instable (Cunningham et al., 1992). D'autres protéines jouent un rôle crucial dans ce processus : la profiline qui cible les monomères au bout plus empêchant ainsi l'auto-nucléation, la cortactine qui stabilise les branches, les protéines de coiffe (« capping proteins ») qui terminent l'élongation des vieux filaments, ou encore les protéines ADF/cofiline qui promeuvent leur dissociation (Figure 4C). Ces différents acteurs moléculaires sont largement sous le contrôle des protéines de la famille des Rho-GTPases : Rac, cdc42 et RhoG. Ainsi, l'injection de Rac dans une cellule entraîne la formation d'un énorme lamellipode autour de la cellule, et la même expérience avec cdc42 conduit à l'apparition de nombreux filopodes (Hall, 1998). Les Rho-GTPases promeuvent à la fois la polymérisation de l'actine en activant Arp2/3 notamment, mais également la stabilisation des nouveaux filaments en inactivant ADF/cofiline (Bugyi and Carlier, 2010; Disanza et al., 2005; Pollard and Borisy, 2003).



#### Figure 4 | L'actine et sa polymérisation sont impliqués dans l'extension de protrusions

Différentes organisations du réseau d'actine sont observées dans la cellule en migration. (A) Un réseau branché au niveau du lamellipode et (B) des faisceaux parallèles dans les filopodes. (C) L'élongation des protrusions est permise par la polymérisation du réseau d'actine associée à de nombreuses protéines. Arp2/3 active la formation d'une nouvelle branche dont la croissance rapide pousse sur la membrane plasmique. Les protéines de coiffe en terminent l'élongation en quelques secondes. En arrière, l'ADF/cofiline promeut la dissociation de l'ADP-actine de l'extrémité (-). Adapté de (Letort et al., 2015; Mellor, 2010; Pollard and Borisy, 2003)

### 1.2.2.2 Adhésion au substrat

Sans adhésion au substrat, le phénomène de « tapis roulant » résultant de la polymérisation de l'actine conduit majoritairement à l'établissement d'un flux rétrograde. La formation d'adhésions, points d'ancrage au substrat, permet à la cellule de générer efficacement des protrusions et un mouvement vers l'avant (Figure 5). La cellule commence par établir de petites adhésions naissantes à l'extrémité du lamellipode qui peuvent être désassemblées rapidement (durée de vie d'environ 60 secondes), ou mûrir et se regrouper d'abord en complexes focaux immédiatement en arrière du lamellipode, puis en adhésions focales plus larges (2µm de large sur 3 à 10µm de long) tout au long de la cellule (Zimerman et al., 2004).

Les adhésions à la matrice extracellulaire sont essentiellement médiées par les protéines transmembranaires de la famille des intégrines. Le domaine extracellulaire des intégrines se lie à des séquences spécifiques de protéines de la matrice extracellulaire telle que la fibronectine, la laminine ou le collagène. Cette liaison engendre un changement de conformation de la protéine qui démasque une courte queue cytoplasmique et promeut son attachement au cytosquelette d'actine. La liaison intégrine-actine implique un certain nombre de protéines structurales, dont les plus connues sont les taline et vinculine, mais également des protéines de signalisation telles que FAK ou Src. Ce réseau de protéines présentes à la jonction intégrine-actine, appelé « adhésome », est ainsi complexe et compterait plus de 200 interactions protéine-protéine (Zaidel-Bar and Geiger, 2010) (Figure 5C).

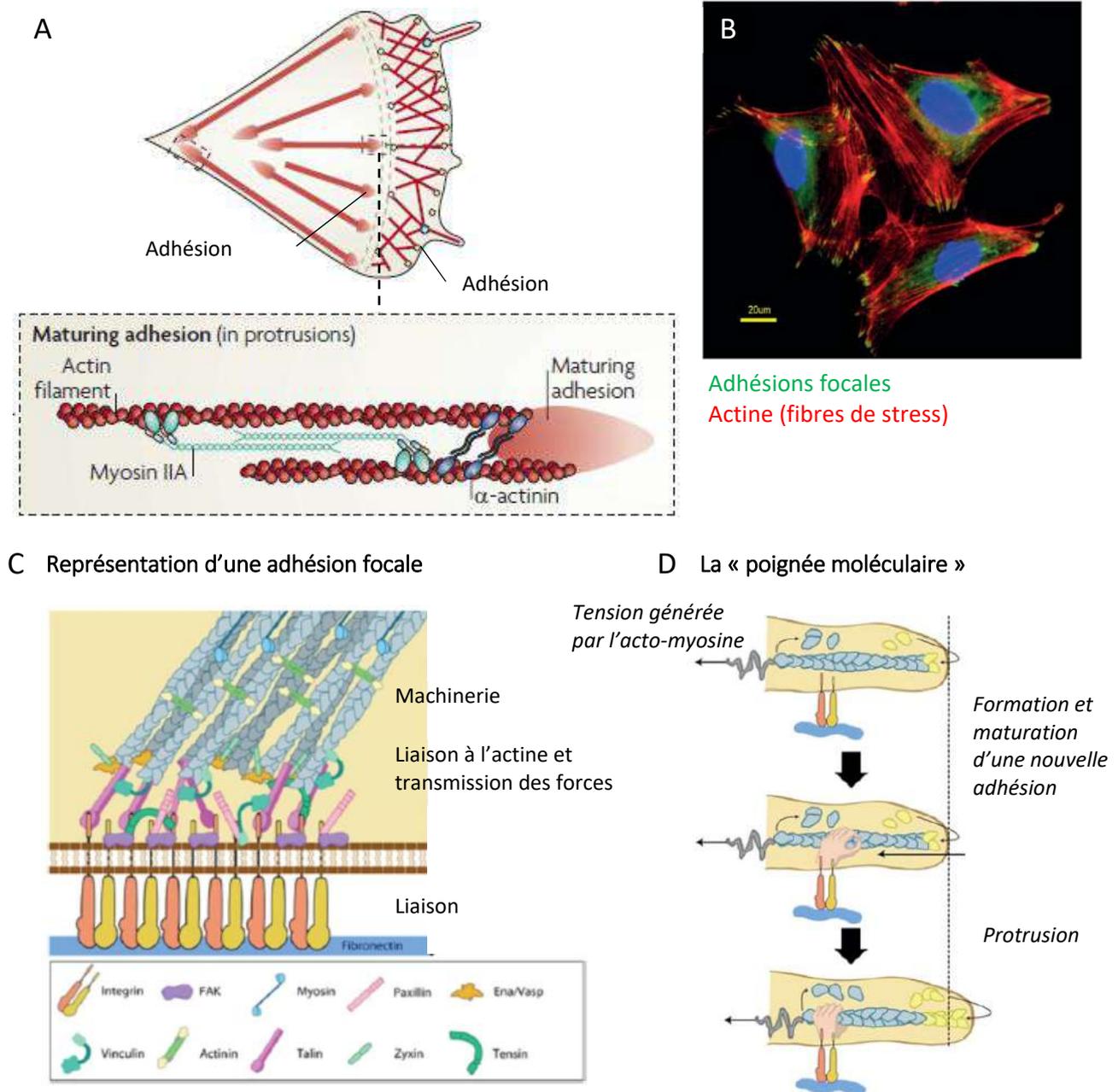
Les complexes d'adhésion sont reliés aux filaments d'actine. Le moteur moléculaire myosine II lie les filaments d'actine entre eux et y exerce une tension. Un réseau de faisceaux d'actine contractile, appelés aussi fibres de stress, s'organise ainsi entre les différents points d'adhésion dans tout le volume cellulaire (Figure 5B). La tension générée le long des fibres de stress est transmise jusqu'aux adhésions et participe à leur stabilisation par le recrutement de nouvelles protéines. Les intégrines, en connectant la cellule et le substrat, agissent comme des points de traction (« molecular clutch ») sur lesquels la cellule peut s'appuyer et transforment les forces contractiles générées par l'acto-myosine en mouvement cellulaire effectif (Figure 5D).

A l'arrière, les forces générées par la myosine II ainsi que la tension résultante de l'avancée de la cellule détachent les adhésions du substrat, ou de la cellule. Plus récemment, la protéase activée par le calcium calpaine a été impliquée dans le désassemblage des adhésions, par le clivage d'un certain nombre de protéines associées aux adhésions focales (Franco and Huttenlocher, 2005).

Si les complexes d'adhésion permettent à la cellule de transmettre des forces au substrat, il est important de noter qu'en retour, les intégrines détectent les forces et contraintes extérieures, les transmettent et les traduisent en signaux biochimiques à l'intérieur de la cellule, un processus appelé

mécanotransduction. Les mécanismes précis de cette conversion restent partiellement connus, mais impliqueraient des changements de conformation des protéines d'adhésion en réponse à une force, permettant la liaison et le recrutement d'autres protéines, de signalisation notamment (Ladoux and Nicolas, 2012).

La structure, la répartition et la dynamique de ces adhésions dans les cellules en migration dépendent fortement du type cellulaire. Par exemple, les cellules à migration amiboïde comme les neutrophiles ou macrophages possèdent de petites adhésions hautement dynamiques qui facilitent leur mouvement rapide. Ces cellules peu adhésives exercent de faibles forces sur le substrat, adoptent une forme ronde et se déplacent majoritairement par le flux d'actine cortical et une forte contractilité (Lämmermann and Sixt, 2009). A l'inverse, des cellules à migration mésenchymateuse comme les fibroblastes établissent de fortes adhésions avec le substrat sur lequel ils « tirent » pour se déplacer.



**Figure 5 | Adhésion au substrat et génération de forces**

(A) Structures adhésives reliées à l'actine dans une cellule en migration. La myosine II est composée de deux chaînes lourdes dont les deux têtes N-terminales constituent le domaine moteur. L' $\alpha$ -actinine lie deux microfilaments d'actine et la myosine IIA les rapproche, générant une force contractile. (B) Immunomarquages des différentes structures adhésives et contractiles dans un fibroblaste. (C) Schéma simplifié d'une adhésion focale, qui comprend des centaines de protéines qui contribuent à quatre processus de base : liaison à la matrice extracellulaire, liaison à l'actine, transduction de signaux intracellulaires et polymérisation de l'actine. (D) Représentation schématisée du principe de « poignée moléculaire ». La liaison des intégrines avec le substrat induit la formation et la croissance d'un complexe d'adhésion relié à l'actine (représenté par la main). Cet ancrage permet de convertir la force générée par la polymérisation de l'actine en protrusions membranaires (Ladoux and Nicolas, 2012; Thomas Parsons et al., 2010).

### 1.2.2.3 Implication du réseau de microtubules

L'implication du cytosquelette d'actine dans la migration cellulaire a été, et reste le sujet de nombreuses études, mais d'autres éléments du cytosquelette tels que les microtubules jouent également un rôle très important dans ce processus. Ainsi, la perturbation pharmacologique du réseau de microtubules altère la migration d'un grand nombre de cellules, tels que les fibroblastes ou les neurones.

Les microtubules sont des polymères polarisés constitués d'hétérodimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ . L'extrémité (-) des microtubules est ancrée à un centre organisateur, le centrosome dans la plupart des cellules. A leur extrémité (+), les microtubules présentent une instabilité dynamique et alternent entre des phases de croissance (polymérisation) et de désassemblage (dépolymérisation) (Figure 6A). Plusieurs modifications post-traductionnelles des tubulines (tyrosination, acétylation par exemple), ainsi que la liaison à différentes protéines appelées MAP (« microtubule associated proteins ») interviennent dans la stabilisation et régulation de la dynamique des microtubules. Par ailleurs, différents moteurs moléculaires comme les dynéines ou les kinésines s'associent aux microtubules et permettent, par une activité ATPase, le transport de vésicules le long des microtubules.

Les microtubules sont les éléments les plus rigides du cytosquelette, et constituent donc le « squelette » interne de la cellule dont ils maintiennent la structure et la forme. La polymérisation des microtubules génère une force de quelques pN (comparable à la force générée par les moteurs moléculaires) (Dogterom and Yurke, 1997). La croissance des microtubules est capable de déformer les membranes, et pourrait donc participer en théorie à la formation de protrusions pendant la migration cellulaire. Néanmoins, dans une cellule en migration, les microtubules sont largement exclus du lamellipode (Figure 6B), à l'exception d'une dizaine de microtubules pionniers qui génèrent des forces insuffisantes pour participer efficacement à la formation des protrusions. En revanche, les microtubules constituent le support du transport intracellulaire vers l'avant de la cellule, indispensable à la formation et au maintien des protrusions (Gierke and Wittmann, 2012; Miller et al., 2009). Ainsi, les microtubules transportent des vésicules membranaires qui participent à la formation des protrusions, mais également des molécules de signalisation telles que Rac ou Cdc42 ou encore de l'ARN messenger codant pour des protéines cruciales pour la polymérisation de l'actine telle que Arp2/3 (Mili and Macara, 2009; Mingle et al., 2005).

Ici encore, l'implication des microtubules dans la migration dépend fortement du type cellulaire. Pour les petites cellules à migration amiboïde, les microtubules sont complètement exclus des protrusions, et jouent un rôle mineur dans leur motilité (Keren et al., 2008). A l'inverse, certaines cellules comme les neurones ou les astrocytes sont beaucoup plus dépendantes des microtubules pour leur déplacement, et en particulier pour la génération de protrusions. Ainsi, l'altération du réseau de microtubules dans ces cellules conduit à une inhibition totale de ce processus. Dans les neurones, le prolongement de

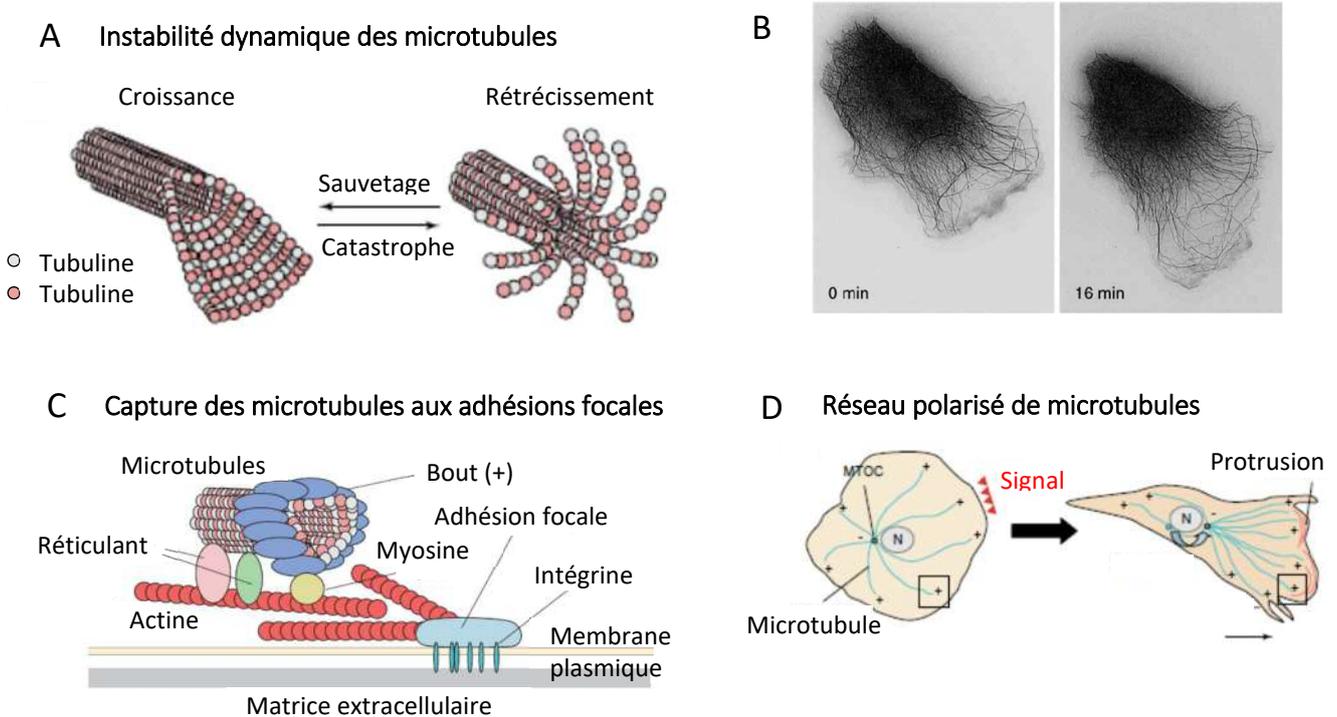
migration est formé en grande partie de faisceaux de microtubules qui s'étendent jusqu'au cône de croissance, structure analogue à un lamellipode situé à l'extrémité des prolongements neuronaux. L'organisation particulière du réseau de microtubules neuronaux en faisceaux denses, associée à leur stabilisation par différentes modifications ou recrutements de MAP pourrait augmenter leur résistance mécanique et soutenir l'extension membranaire à l'avant (Etienne-Manneville, 2013; Kapitein and Hoogenraad, 2015).

Les microtubules sont également impliqués dans la formation et la maturation des adhésions focales. Par le transport dirigé des intégrines à la membrane plasmique à l'avant de la cellule, les microtubules promeuvent la formation des complexes d'adhésion. Ainsi les microtubules sont dirigés et capturés au niveau des adhésions naissantes, et permettent le transport de cargos protéiques nécessaires à leur croissance (Kaverina et al., 1998) (Figure 6C). Comme précédemment évoqué, les adhésions focales en arrière du lamellipode mûrissent grâce aux forces générées par les fibres contractiles d'acto-myosine, et il n'existe pas à l'heure actuelle de preuves d'une implication directe des microtubules dans ce processus. En revanche, les microtubules pourraient participer de manière indirecte à la maturation des adhésions focales, ici encore par le transport de protéines associées à l'acto-myosine. Par ailleurs, il a été observé que la dépolymérisation pharmacologique des microtubules induit une augmentation de la contractilité cellulaire et de l'activité de Rho. Ce résultat suggère que, de manière indirecte, la dépolymérisation des microtubules au niveau des sites d'adhésion pourrait augmenter localement la contractilité et ainsi promouvoir leur maturation (Danowski, 1989).

Les microtubules sont également des acteurs importants du désassemblage des adhésions à l'arrière de la cellule. Ainsi, un traitement au nocodazole, un agent dépolymérisant des microtubules, conduit à l'accumulation d'intégrines en larges adhésions focales. A l'inverse, le lavage de cette drogue induit la repolymérisation rapide des microtubules associée à une diminution importante du nombre d'adhésions focales. Les mécanismes expliquant le rôle des microtubules dans le désassemblage des adhésions ne sont pas complètement élucidés, mais impliqueraient là encore le transport de différentes molécules, de signalisation ou liées à l'endocytose des intégrines (Ezratty et al., 2009).

De manière générale, si le réseau d'actine est organisé dans la cellule en modules locaux et indépendants, les microtubules, eux, forment un réseau continu qui s'étend dans tout le volume cytoplasmique. La continuité et la polarisation de ce réseau est essentielle pour le transport intracellulaire à longue distance et plus généralement à la coordination spatiale et temporelle des différentes étapes de la migration (Figure 6D). Ainsi, le rôle principal du réseau de microtubules est de

maintenir une activité intracellulaire polarisée et un positionnement correct d'activités cellulaires spécifiques, indispensable pour une migration efficace.



**Figure 6 | Les microtubules dans la cellule en migration**

(A) Les microtubules sont formés de dimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  assemblés en protofilaments qui s'associent par 13 pour former un tube creux polarisé avec une extrémité (+) et (-). Les bouts (+) des MTs alternent entre des phases de croissance et de rétrécissement, un processus appelé instabilité dynamique (B) Microtubules (MTs) dans un fibroblaste en migration visualisés par une injection de tubuline fluorescente (contraste inversé) (C) Les microtubules sont guidés le long des filaments d'actine et capturés au niveau des adhésions focales. Des protéines variées telles que des protéines de réticulation, associées aux bouts (+) des MTs ou des moteurs moléculaires sont impliquées dans ce processus. (D) Dans les cellules non motiles, le centre organisateur des microtubules (centrosome) organise au centre de la cellule un réseau homogène de MTs, bout (+) orientés vers la membrane. En présence d'un signal motogénique, le centrosome se place en avant et le réseau de MTs se dirige vers l'avant (Watanabe et al., 2005; Wittmann and Waterman-Storer, 2001).

### 1.3 La migration dirigée

La migration de bactéries, ou d'organismes eucaryotes comme *Dictyostelium discoideum* est essentiellement tournée vers la recherche d'une source de nourriture. Même si la migration cellulaire chez les eucaryotes multicellulaires est un processus bien plus complexe, intégré, finement régulé et coordonné, la migration à l'échelle d'une cellule peut être vue comme un déplacement en recherche d'une cible. La migration dirigée, ou directionnelle, est donc un composant crucial du processus de déplacement des cellules.

Le déplacement et la trajectoire des cellules en migration peuvent être découplés et caractérisés quantitativement en deux propriétés : la persistance de direction (i.e la capacité de se déplacer dans une même direction sur une période de temps donnée) et la motilité (ou vitesse). La motilité cellulaire peut être activée de manière intrinsèque et autonome, ou le plus souvent en réponse à un signal motogénique (qui stimule la migration) présenté de manière homogène dans l'espace. La migration directionnelle ou dirigée peut avoir deux origines : la principale est la réponse à un signal extérieur, souvent présenté de manière asymétrique (gradient, etc.). Dans un certain nombre de cas, on observe néanmoins une migration dirigée en l'absence de tout signal extérieur, ce qui fait intervenir des propriétés de polarisation intrinsèques (i.e. persistance de direction intrinsèque) (Petrie et al., 2009) (Figure 7A).

Il est intéressant de noter des divergences sur les relations entre directionnalité et vitesse dans la migration cellulaire. Maiuri et al. démontrent pour un grand nombre de types cellulaires une relation générale entre la directionnalité et la vitesse, les cellules les plus rapides étant les plus persistantes (Maiuri et al., 2015). Ce résultat va à l'encontre de plus vieilles observations qui liaient les cellules les plus lentes à une plus grande persistance de direction (Lauffenburger and Linderman, 1993; Pankov et al., 2005), ou d'un certain nombre de perturbations cellulaires affectant l'un de ces paramètres indépendamment de l'autre (Pankov et al., 2005).

### 1.3.1 Polarisation cellulaire

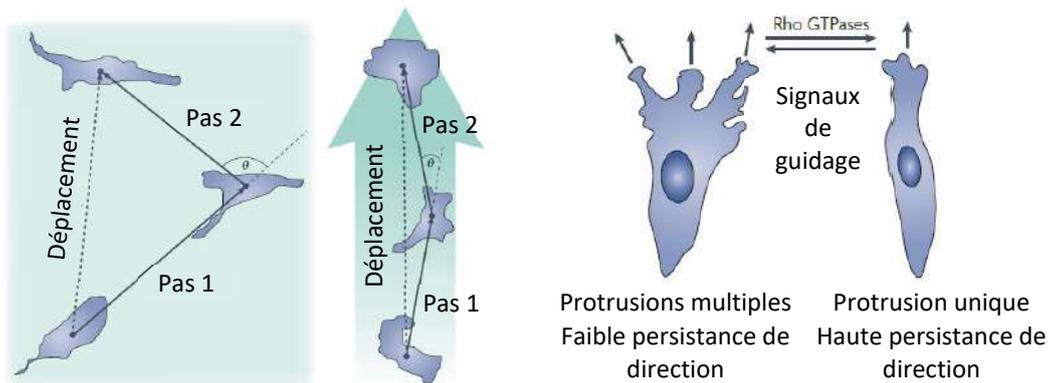
Dans tous les cas, la migration dirigée implique une forte polarisation cellulaire, c'est-à-dire l'établissement et le maintien d'une forte asymétrie avant-arrière, morphologique et fonctionnelle (Figure 7B). Structurellement, le centrosome et le réseau de microtubules associés sont centraux dans la polarité cellulaire. Dans la plupart des cellules en migration (à l'exception de cellules amiboïdes à migration rapide), on observe un positionnement du centrosome à l'avant du noyau, dans la direction de migration. Cette position du principal centre organisateur des microtubules organise un réseau dense de microtubules vers l'avant de la cellule, et aligné selon l'axe avant-arrière (Figure 6D). Cette organisation permet donc un transport intracellulaire polarisé et par conséquent le maintien de gradient de signalisation par exemple, et plus généralement de modules d'activités spécifiques et différents à l'avant et à l'arrière.

Il est maintenant bien établi que le mouvement cellulaire directionnel repose majoritairement sur la formation et la stabilisation de protrusions à l'avant qui maintiennent l'orientation de la cellule et son mouvement dans une direction donnée (Figure 7A). Les nouvelles protrusions se forment généralement à partir de protrusions déjà établies à l'avant de la cellule. Dans un certain nombre de cas, comme les neurones qui étendent plusieurs branches, ou les cellules endothéliales qui forment différentes

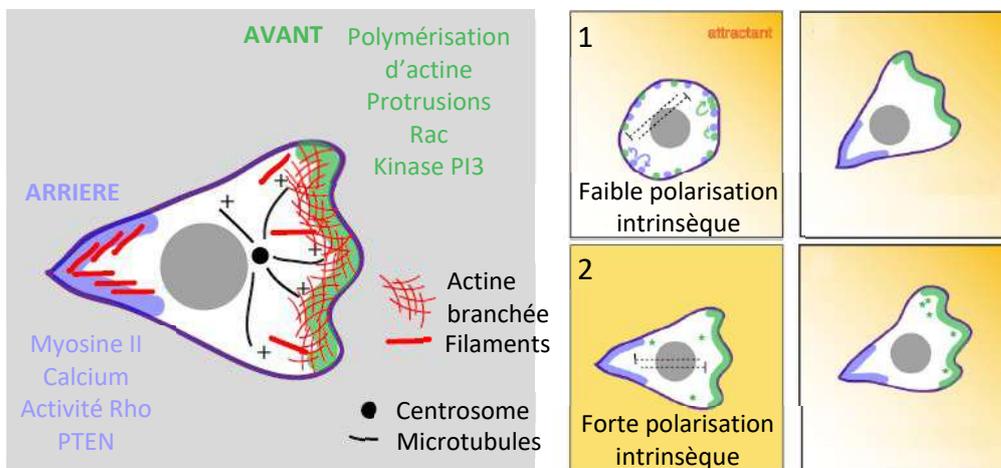
protrusions à l'extrémité des vaisseaux en croissance, c'est la branche la plus stable qui détermine la direction de migration (Fischer et al., 2009; Martini et al., 2009). Les processus qui restreignent la formation de protrusions latérales sont donc à la base de la migration directionnelle dans la plupart des cellules.

De la même manière, les signalisations impliquées dans la génération de protrusions à l'avant de la cellule sont à même de jouer un rôle important dans le contrôle de la directionnalité. Plus généralement, le maintien d'une asymétrie moléculaire et fonctionnelle entre l'avant et l'arrière de la cellule est essentiel pour conserver un mouvement dirigé. La GTPase Rho Cdc42, associée au complexe de polarité Par (Par3/Par6/aPKC) est un régulateur central de la polarité cellulaire. Cdc42 et le complexe Par sont actifs à l'avant de la cellule et impliqués dans une large variété de processus cellulaires, comme la régionalisation de la formation du lamellipode, la position du centrosome ou la stabilisation des microtubules (Ridley et al., 2003). Cdc42 recrute et promeut indirectement la localisation d'une autre GTPase, Rac1 à l'avant de la cellule, où elle active via le complexe WAVE le complexe Arp2/3 et la polymérisation du réseau branché d'actine (Petrie et al., 2009; Ridley et al., 2003). L'activation locale de Rac1 au lamellipode, par l'utilisation d'une forme photo-activable, est suffisante pour maintenir la polarité et la directionnalité de la cellule (Wu et al., 2009) (Figure 7C). De même, des interneurons corticaux mutants pour Rac1 et Rac3 montrent des défauts dans l'élongation et la morphologie de leur prolongement de migration, associés à des défauts de migration directionnelle (Tivodar et al., 2015). En revanche, Pankov et al. montrent que l'inhibition globale de l'activité de Rac1 augmente la persistance de direction, et qu'un changement faible de l'activité globale de Rac1 peut déclencher le passage d'une migration aléatoire à dirigée (Pankov et al., 2005). Ces résultats indiquent ainsi que ces mécanismes sont complexes et doivent être finement régulés, en particulier dans leur localisation spatiale.

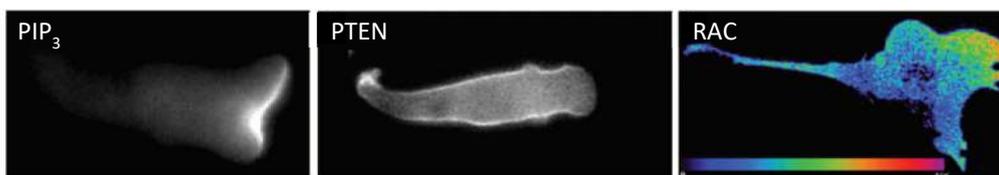
## A Concepts de migration directionnelle



## B Polarisation interne



## C Réponse moléculaires liées à la polarisation cellulaire



## Figure 7 | Principes de migration directionnelle et de polarisation cellulaire

(A) En présence d'un signal motogénique uniforme, la cellule en migration présente une migration aléatoire (persistance de direction =  $(\text{Pas1} + \text{Pas2}) / \text{Déplacement}$  est faible). La présence d'un signal polarisant asymétrique déclenche une migration dirigée (persistance de direction proche de 1). La migration directionnelle est souvent associée à la suppression de protrusions latérales. (B) La cellule en migration présente une polarisation interne, c'est-à-dire une asymétrie structurale et fonctionnelle entre l'avant et l'arrière. Certaines cellules présentent une faible polarisation intrinsèque. La présence d'un signal externe asymétrique établit différents modules moléculaires à l'avant et à l'arrière : la cellule se polarise (1). D'autres cellules présentent une forte polarisation intrinsèque même en l'absence de signal externe. Ce signal renforce la polarisation et promeut la formation de protrusions vers le signal (2). (C) Localisation de PIP<sub>3</sub> et PTEN (fusionné à la GFP) dans une cellule de *Dictyostelium* répondant à un chémoattractant. PIP<sub>3</sub> est localisé à l'avant de la cellule, PTEN en est exclu mais présent sur les côtés et à l'arrière de la cellule. Localisation de la forme activée de Rac par FRET dans un fibroblaste. Rac est localisé au niveau des protrusions à l'avant de la cellule.

(Petrie et al., 2009; Ridley et al., 2003; Rorth, 2011)

### 1.3.2 Chimiotaxie

Si la plupart des cellules en migration initient spontanément leur polarisation, la présence d'un signal de guidage externe reste indispensable à une migration cellulaire ciblée. La nature de ce signal, molécules chimiques solubles, molécules d'adhésion, nature biophysique du substrat, champ électrique, etc., détermine le type de guidage (*-taxie*, déplacement orienté d'un organisme vivant lié à un stimulus extérieur).

La chimiotaxie, le guidage cellulaire par un gradient de molécules chimiques, est probablement le type de guidage le mieux décrit. Les cellules sont ainsi capables de détecter des gradients de concentration de molécules chimiques et de s'orienter vers les régions de plus fortes concentrations. De manière remarquable, les cellules sont capables de répondre à de faibles gradients (moins de 10% de différence de concentration entre l'avant et l'arrière de la cellule). Ces faibles différences doivent donc être amplifiées en gradients de signalisation intracellulaire plus forts pour générer une réponse cellulaire. Ce processus d'amplification implique notamment la kinase PIP3, qui s'accumule rapidement à l'avant de la cellule en réponse à l'application d'un chimioattractant, tandis que la phosphatase PTEN devient restreinte aux côtés et arrière de la cellule (Figure 7C). Ainsi, l'altération de l'un de ces deux éléments réduit la capacité des cellules à migrer de manière directionnelle en réponse à un gradient chimique. Les mécanismes sous-jacents impliquent un réseau de boucles de régulation positives entre PIP3K, PTEN et Cdc42 qui initient et maintiennent la polarité cellulaire (Devreotes and Janetopoulos, 2003; Ridley et al., 2003).

On a vu dans ce chapitre que la migration cellulaire est impliquée dans de nombreux processus biologiques, physiologiques ou pathologiques. Ce mouvement des cellules peut prendre de nombreuses formes et manifestations, mais repose dans l'immense majorité des cas sur des transformations du cytosquelette coordonnés dans le temps et l'espace. Un concept central dans les processus de migration cellulaire est celui de polarisation. Visible au niveau cellulaire et sub-cellulaire, elle est indispensable à l'établissement d'un mouvement dirigé et organisé.

---

## 2 L'influence du microenvironnement sur la migration cellulaire

---

### Sommaire

---

#### 2.1 Propriétés des environnements cellulaires

- 2.1.1 Plasticité des modes de migration
- 2.1.2 Complexité des environnements cellulaires

#### 2.2 Influence de différents paramètres physiques sur la migration cellulaire

- 2.2.1 Géométrie de l'environnement adhésif et architecture cellulaire
- 2.2.2 Migration sous confinement en 3D
- 2.2.3 Influence de la rigidité du substrat sur la migration cellulaire

#### 2.3 Topographie et guidage par contact

- 2.3.1 Effet de la topographie sur l'adhésion cellulaire
- 2.3.2 Effet de la topographie sur la morphologie et l'alignement cellulaire
- 2.3.3 Effet de la topographie sur la migration cellulaire
- 2.3.4 Mécanismes intracellulaires impliqués
- 2.3.2 Effet de la topographie sur le guidage axonal

#### 2.4 Compétition et intégration de différents signaux extracellulaires

---

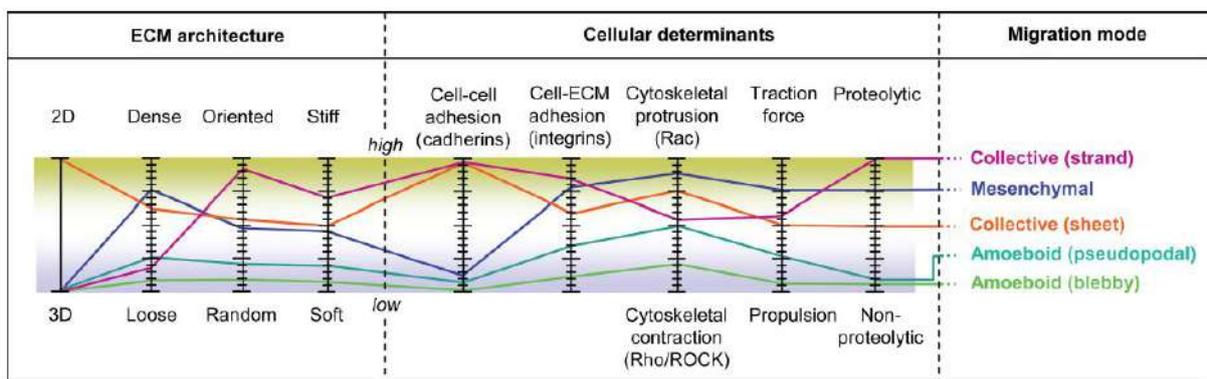
Les cellules en migration évoluent dans des environnements variés tant sur le plan de leur composition cellulaire et biochimique que sur leur organisation géométrique, physique et mécanique. L'influence de ces indices « physiques » sur le mouvement des cellules est maintenant bien avéré. Dans ce chapitre, nous allons effectuer une synthèse des principaux résultats portant sur l'influence de quelques paramètres physiques, et en particulier de la topographie, sur la migration cellulaire.

## 2.1 Propriétés des environnements cellulaires

### 2.1.1 Plasticité des modes de migration

Dans les années 80, Albrecht-Buehler décrit le comportement de fragments de fibroblastes humains, et observe que ces fragments sont capables de produire presque tout spectre de morphologies membranaires (filopodes, « blebbs » ou « ruffles ») observées sur des cellules en migration (Albrecht-Buehler, 1980). Des études plus récentes observent qu'un même type cellulaire peut adopter des morphologies très différentes en fonction de la dimension, 2D ou 3D du substrat. Ces résultats suggèrent que la cellule possède tous les éléments pour adopter différents phénotypes migratoires, et que l'environnement extracellulaire détermine largement son comportement. Au sein d'un organisme multicellulaire, les cellules migrent dans des environnements très différents qui modulent l'adhésion cellulaire et l'organisation du cytosquelette et ainsi la morphologie cellulaire et le comportement migratoire. Une même cellule peut ainsi changer de phénotype migratoire en réponse à une modification de son environnement, et un certain nombre de transitions, physiologiques ou pathologiques, entre différents modes de migration ont été décrites (Friedl, 2004).

Aujourd'hui, il apparaît que le mode de migration dépend d'une combinaison de paramètres souvent interdépendants : facteurs cellulaires intrinsèques basés sur le répertoire moléculaire de la cellule, et facteurs extracellulaires basés sur les propriétés de l'environnement. Friedl propose ainsi le placement de chaque mode de migration sur un graphique en fonction de la nature et du niveau des différents facteurs qui l'influencent (Friedl and Wolf, 2010) (Figure 8).



**Figure 8 | Déterminants de la migration et plasticité des modes de migration**

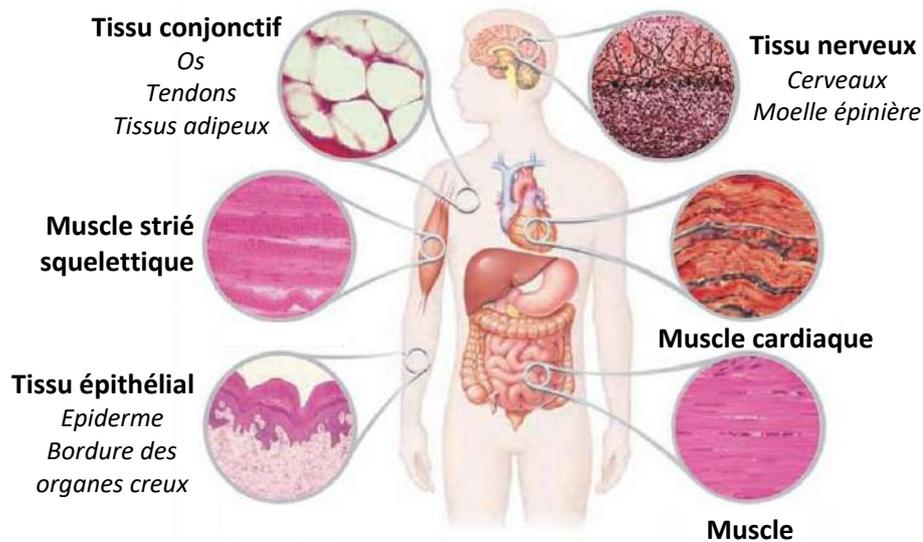
Modèle proposé dans (Friedl and Wolf, 2010) qui combine plusieurs paramètres interdépendants qui influencent le mode de migration. Les différents profils de plusieurs modes de migration sont représentés par les lignes colorées. La modulation de chacun de ces paramètres est susceptible d'influencer le comportement migratoire voire de modifier le mode de migration.

### 2.1.2 Complexité des environnements cellulaires

Un organisme vivant est composé d'une variété de tissus de compositions et d'organisations très différentes (Figure 9). L'environnement cellulaire que rencontrent différentes cellules en migration, ou une seule cellule sur son parcours peut donc être très variable.

Au sein des tissus, les différents types de cellules s'organisent de manière variable (très jointives dans les épithéliums, alignées dans les tissus musculaires, etc.). Les cellules sont entourées d'une masse importante de protéines et macromolécules appelée matrice extracellulaire, ou encore ciment intercellulaire. Cette matrice est constituée de glycoprotéines telles que la fibronectine ou la laminine, de fibres (collagène, élastine) et de glycosaminoglycanes et protéoglycanes qui forment un gel hydraté baignant les cellules. Par ailleurs, la matrice extracellulaire intègre un certain nombre de molécules diffusives telles que les hormones, cytokines, anticorps, etc. Quel que soit le tissu, l'environnement cellulaire rencontré par une cellule en migration est donc toujours composé par les cellules avoisinantes et la matrice extracellulaire, mais l'importance relative de ces deux composantes peut varier.

Si les propriétés cellulaires et chimiques sont depuis longtemps bien décrites et prises en compte dans les processus migratoires, une autre composante de cet environnement a été pendant longtemps ignorée par les biologistes : l'environnement physique qui regroupe les propriétés biophysiques et géométriques de l'environnement cellulaire et matriciel telles que la topographie ou la rigidité (Charras and Sahai, 2014) (Figure 9).

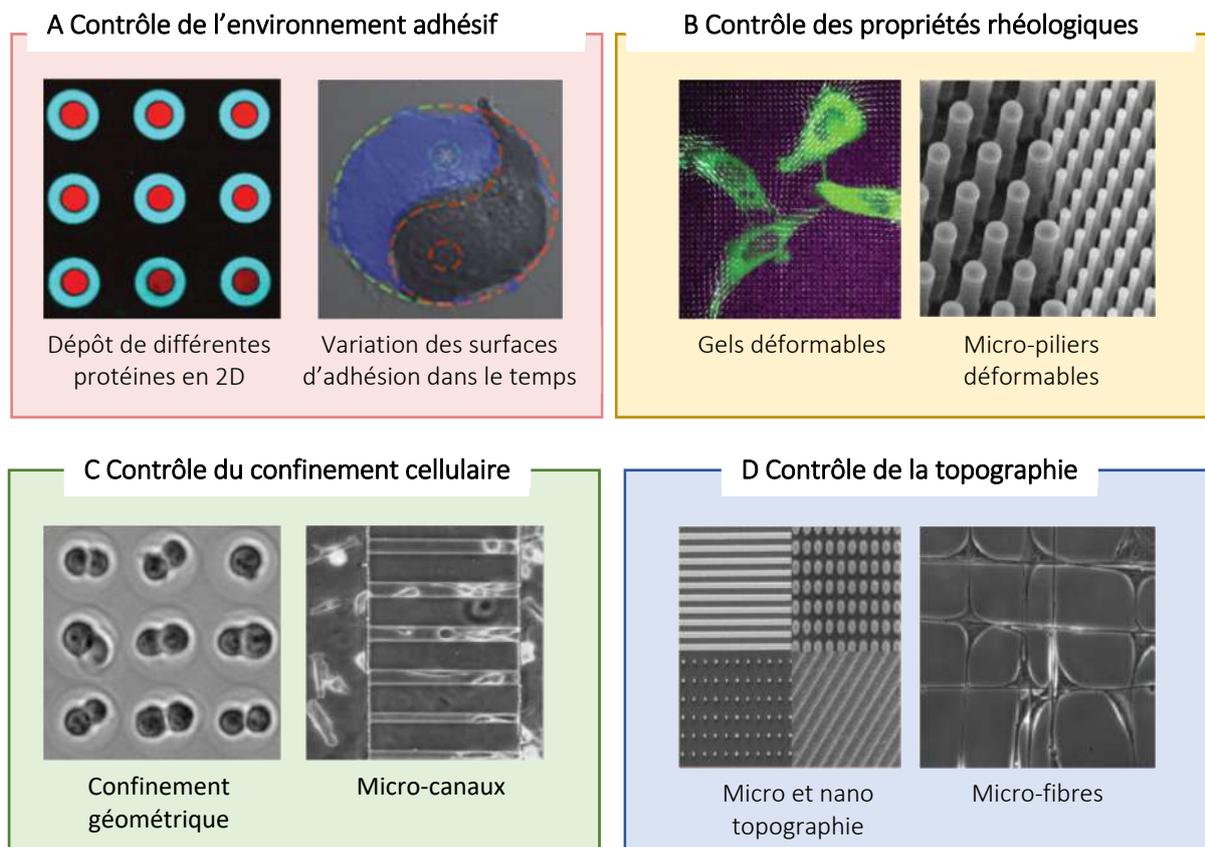


Environnement	Rigidité	Confinement	Adhésion	Topographie
Collagène interstitiel	Fort	Important. Pores 5-20µm	Adhésion par les intégrines Les cellules du système immunitaire peuvent exploiter le confinement pour migrer sans adhésions dépendantes des intégrines	Plutôt discontinu
Dans les vaisseaux sanguins	Celle des cellules endothéliales qui le bordent	Dépendante de la taille des vaisseaux	Les cellules endothéliales expriment des ligands aux intégrines pour les leucocytes. Peut être difficile à cause du flux sanguin	Surface des vaisseaux continue et presque lisse
Migration intra épithéliale	Celle des cellules endothéliales	Important	Les cadhérines peuvent être utilisées dans des contacts cellule-cellule. Sinon protéoglycanes à la surface des cellules	Plutôt continue
Cicatrisation de tissus épithéliaux	Variable	Important à l'exception des cellules qui migrent à la surface de la blessure	Abondance de ligands aux intégrines	Plutôt plane
Cerveau	Faible	Complexe, mais les cellules sont entourées de toute part	Variétés de substrats possibles : ligands aux intégrines, autres cellules et cadhérines, matrice extracellulaire	Complexe

Figure 9 | Diversité des environnements de migration dans l'organisme

Adapté de (Charras and Sahai, 2014) et <http://slideplayer.com/slide/7385253/>

Les avancées dans la compréhension de l'influence des paramètres physiques de l'environnement sur un certain nombre de processus biologiques, dont la migration cellulaire, ont été rendues possibles par le développement d'approches et de technologies interdisciplinaires. Des techniques issues de l'optique et des nanotechnologies comme la microscopie à force atomique ont permis de caractériser les propriétés mécaniques des cellules et de leur environnement. L'analyse systématique de l'influence de différentes variables physiques sur la migration cellulaire requiert un contrôle expérimental fort de l'environnement extracellulaire, difficile à obtenir *in vivo*. Le développement des techniques de microfabrication, micropatterning et microfluidique issues de la microélectronique ont permis la conception de micro-environnements contrôlés dans lesquels l'influence d'un grand nombre de paramètres physiques sur la migration a pu être mise en évidence (rigidité, confinement, topographie que nous allons détailler par la suite) (Charras and Sahai, 2014; Lautenschläger and Piel, 2013; Ruprecht et al., 2017; Théry, 2010) (Figure 10).



**Figure 10 | Contrôle expérimental de différents paramètres physiques du micro-environnement**

Gauche : dépôt de différentes protéines en 2D (E-Cadhérine en bleu, fibronectine en rouge). Droite : étalement cellulaire avant (gris) et après (bleu) ajout de fibronectine biotinylée se liant spécifiquement à la partie haute du pattern. (B) Gauche : fibroblastes sur un gel de polyacrylamide. Droite : série de micro-piliers déformables de rigidité variable. (C) Gauche : cellules confinées dans des microcratères de géométrie contrôlée. Droite : passage de cellules dans des micro-canaux de PDMS. (D) Différents exemples de micro-topographie sur des substrats de polystyrène. Gauche : fibroblastes sur des fibres artificielles. Adapté de Ruprecht et al., 2017

## 2.2 Influence de différents paramètres physiques sur la migration cellulaire

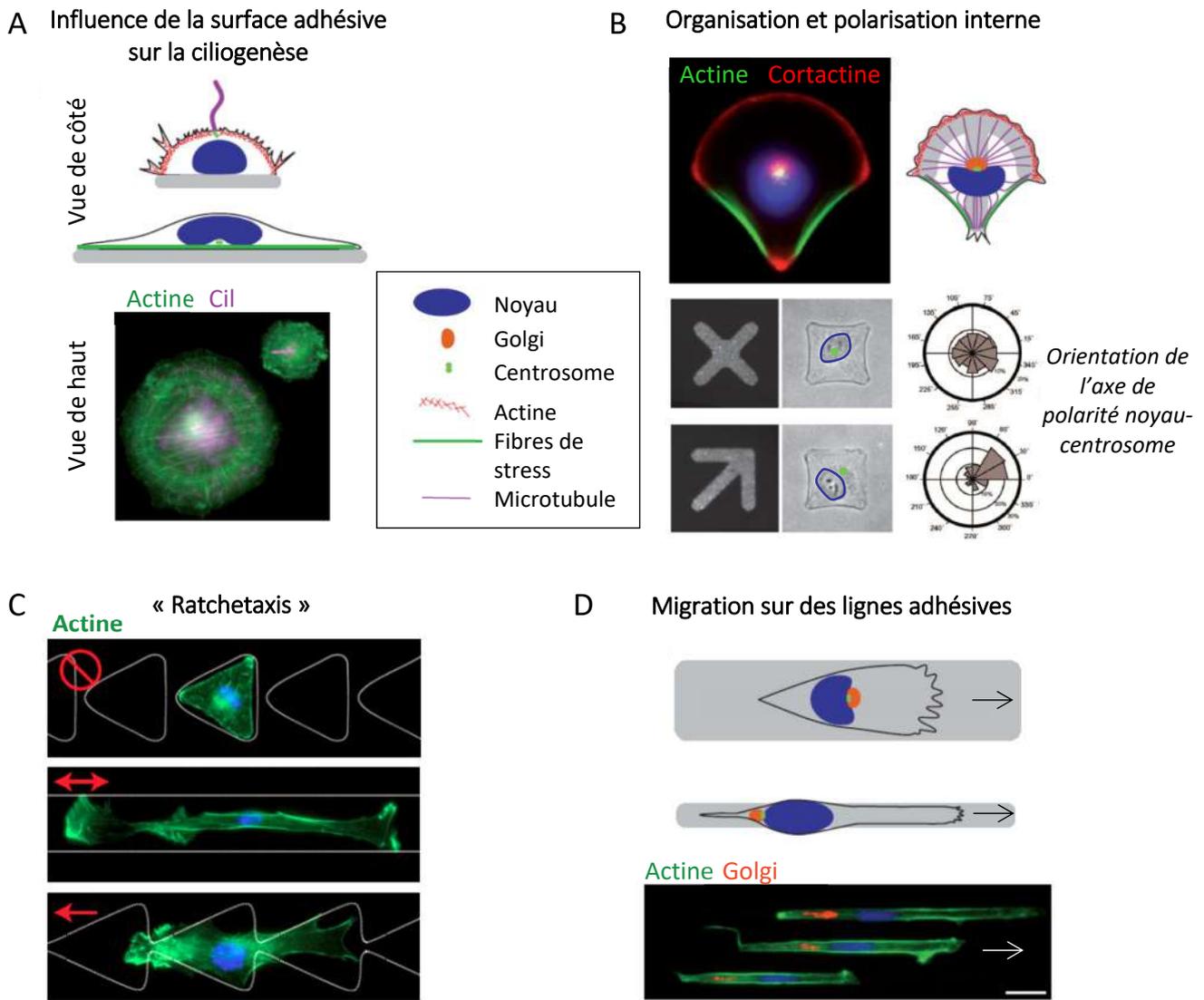
### 2.2.1 Géométrie de l'environnement adhésif et architecture cellulaire

En conditions de culture « classiques », les cellules en migration sont étudiées sur un substrat adhésif plat et homogène. *In vivo*, l'architecture de l'environnement détermine la géométrie et la distribution des surfaces adhésives qui sont souvent restreintes et complexes. Le développement des techniques de « micropatterning », qui permettent de contrôler la géométrie et la nature des surfaces d'adhésion déposées sur un substrat de migration, a permis de faire un pas vers les conditions physiologiques.

Le confinement des cellules sur des surfaces adhésives de différentes formes permet de contrôler et de moduler l'architecture cellulaire, l'organisation et la polarité intracellulaire. En effet, l'établissement d'adhésions avec le substrat influence l'organisation du cytosquelette et ainsi l'organisation interne et l'architecture globale de la cellule. Ainsi, la surface des zones d'adhésion peut modifier le positionnement du centrosome et la ciliogenèse : des cellules confinées sur une petite surface voient leur centrosome assembler un cil primaire à la surface dorsale. A l'inverse, des cellules étalées sur une plus grande surface ont leur centrosome placé ventralement au contact du substrat (Pitaval et al., 2010) (Figure 11A). L'utilisation de « patterns » adhésifs symétriques ou asymétriques a permis de montrer un positionnement reproductible du centrosome au niveau du centroïde de la cellule, et un axe de polarisation noyau/centrosome orienté vers les régions les plus adhésives (Théry et al., 2006) (Figure 11B). Ce même type d'approche expérimentale a également permis de montrer que la formation localisée de lamellipode dépend du rapport d'aspect général de la surface adhésive, ainsi que de la courbure locale (James et al., 2008).

L'utilisation de « patterns » asymétriques en forme de larme sur des cellules motiles montre la formation d'un réseau d'actine rigide au niveau de la partie courbée du motif. La polarité cellulaire s'organise de la partie pointue vers la partie courbée, et les cellules détachées de ce motif par une courte décharge électrique s'échappent dans la direction de la partie courbée, ce qui indique que l'orientation de la migration dépend largement des contraintes géométriques externes (Jiang et al., 2004). Sur un motif en forme de triangle, les cellules forment des protrusions au niveau de la pointe, et une ligne formée d'un enchaînement de triangle guide ainsi la migration séquentielle des cellules d'un triangle à un autre (Mahmud et al., 2009) (Figure 11C). Ce type de guidage a depuis été nommé « ratchetaxis » (en référence à la forme d'une roue crantée) et généralisé au mouvement cellulaire directionnel en réponse à des indices anisotropiques répétés (Caballero et al., 2015).

Des motifs symétriques peuvent également avoir une influence sur la migration cellulaire. Sur des pistes larges de fibronectine, une majorité de cellules en migration voient leur centrosome positionné devant le noyau et dans la direction du mouvement, comme décrit classiquement. En revanche, confinées sur de fines lignes, le centrosome passe en arrière du noyau dans une majorité des cellules, une configuration également observée *in vivo* pour certains types cellulaires en migration contrainte (Pouthas et al., 2008) (Figure 11D). Ces cellules se déplacent également de manière plus rapide et plus directionnelle que des cellules placées sur un environnement homogène et récapitulent la plupart des caractéristiques de cellules migrant dans un gel de collagène 3D (déplacement coordonné de l'avant et l'arrière, dépendance à la contractilité de l'acto-myosine et aux microtubules) (Doyle et al., 2009; Pouthas et al., 2008). Ces résultats suggèrent que le mouvement des cellules sur de fines lignes adhésives est plus proche du mouvement physiologique dans un environnement en 3D que du mouvement observé sur des surfaces planes homogènes.



**Figure 11 | Influence de la géométrie des surfaces adhésives sur la polarisation et la migration cellulaire**

(A) Des cellules confinées sur une zone d'adhésion restreinte assemblent un cil primaire à leur surface dorsale. A l'inverse, des cellules étalées sur une large surface adhésive ont un centrosome positionné ventralement au contact du substrat, et n'assemblent pas de cil (Pitaval et al., 2010; Théry, 2010) (B) Sur une surface adhésive en forme d'arc, le centrosome et Golgi sont placés au centre de la cellule et le noyau déplacé vers le côté contractile non adhésif. L'utilisation de patrons adhésifs symétriques ou asymétriques montre la localisation du centrosome au centre de la cellule, et l'axe de polarité noyau/centrosome orienté depuis les côtés non adhésifs vers les côtés adhésifs (Théry, 2010; Théry et al., 2006) (C) Des cellules placées sur des triangles adhésifs isolés ne bougent pas, des cellules placées sur des lignes adhésives se déplacent dans les 2 directions et des cellules sur des triangles connectés se déplacent de manière directionnelle vers les pointes des triangles, un processus nommé « ratchetaxis » (Mahmud et al., 2009) (D) Sur une ligne adhésive large, le centrosome est placé en avant du noyau dans la direction du mouvement. Sur une ligne fine, le centrosome passe derrière le noyau (Pouthas et al., 2008; Théry, 2010).

### 2.2.2 Migration sous confinement en 3D

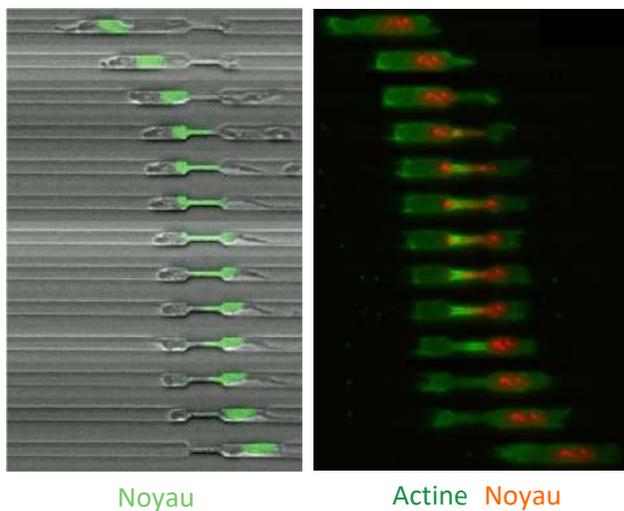
*In vivo*, les cellules migrent dans un environnement 3D complexe et souvent très encombré. Un certain nombre de cellules sont donc amenées à être confinées pendant leur déplacement. Les contraintes spatiales à l'origine de la migration confinée impliquent un certain nombre d'adaptations cellulaires et d'écarts aux modèles classiques de migration souvent établis sur des cellules migrant sur des surfaces planes. Ainsi, la géométrie des espaces contraints (interstices, tunnels, pores, etc.) *in vivo* empêche le plus souvent la formation de structures protrusives planes de type lamellipode. Dans ce contexte, d'autres structures assurent cette fonction, comme des filopodes ou des « blebbs » membranaires formés par la pression hydrostatique interne (Petrie et al., 2012; Tozluoglu et al., 2013; Wilson et al., 2013). Ainsi, on peut observer une moindre dépendance à Rac1 ou Arp2/3 dans un certain nombre de cas de migration sous confinement. A l'inverse, l'importance de la contractilité du système d'acto-myosine est augmentée (Hung et al., 2013; Wilson et al., 2013). En effet, si sur une surface 2D une forte contractilité peut être préjudiciable car elle amène au détachement des adhésions, elle peut être bien mieux tolérée quand la cellule est confinée entre plusieurs surfaces et donc dans l'impossibilité de se détacher.

La migration sous confinement concerne en particulier les cellules du système immunitaire. A l'arrivée d'un pathogène, les neutrophiles en circulation dans le flux sanguin traversent l'endothélium vasculaire pour rejoindre la zone infectée. Cette traversée implique une importante déformation cellulaire. Cette migration confinée peut être en partie reproduite et étudiée *in vitro* dans des micro-canaux avec des constriction de taille contrôlée. Une étude récente montre que des neutrophiles dérivés d'une lignée cellulaire HL60 utilisent des mécanismes différents lors d'une migration confinée ou non. En effet, au passage des constriction, la polymérisation d'actine concentrée jusqu'alors à l'avant est observée majoritairement à l'arrière de la cellule, et au niveau du noyau au passage des constriction (Figure 12A). La cellule semble donc adapter l'organisation de son système d'acto-myosine aux contraintes spatiales et mécaniques de son environnement. Ainsi, dans cette même étude, les auteurs observent que le passage des constriction s'effectue indépendamment de la myosine II, sauf pour le passage d'interstices inférieurs à 1,5 $\mu\text{m}$  (Thiam et al., 2016). Les cellules dendritiques exercent des fonctions de sentinelles et patrouillent les tissus, et sont donc également soumises à de fortes contraintes spatiales. Sous confinement, ces cellules augmentent leur motilité et présentent la particularité de migrer sans dépendre de l'établissement d'adhésions (Lämmermann et al., 2008).

Dans le cadre des processus métastatiques, les cellules tumorales se disséminent dans l'organisme à partir d'une tumeur primaire et traversent ainsi une variété d'environnements parfois très denses. Dans des micro-canaux étroits, un certain nombre de cellules cancéreuses adoptent une migration spontanée

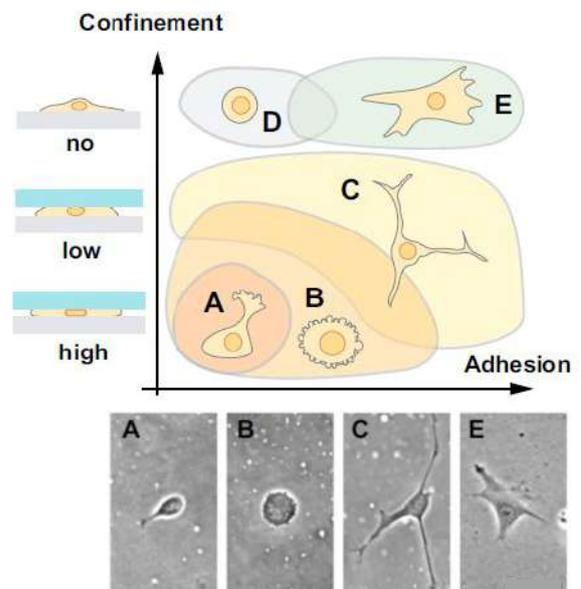
rapide et persistante (Irimia and Toner, 2009). Ainsi, il a été proposé d'utiliser ce type de dispositif expérimental pour tester la capacité d'invasion des cellules tumorales, qui est corrélée à leur capacité et leur rapidité à passer de fines constriction dans un canal (Rolli et al., 2010). De manière remarquable, il a été montré par ailleurs que sous confinement et en l'absence d'adhésions, des cellules mésenchymateuses peuvent spontanément adopter une migration rapide de type amiboïde (Liu et al., 2015) (Figure 12B). Ces résultats indiquent un rôle majeur du confinement cellulaire dans la transition mésenchymateuse-amiboïde, qui est observée chez les cellules cancéreuses, et plus généralement l'importance des propriétés géométriques et mécaniques du microenvironnement dans les processus d'invasion tumorale.

### A L'utilisation de micro-canaux pour étudier la migration confinée



Passage de cellules dendritiques dans des constriction

### B Transition mésenchymateuse-amiboïde sous confinement



### Figure 12 | La migration cellulaire sous confinement

(A) L'utilisation de micro-canaux avec des constriction permet d'étudier la migration confinée. Exemple d'une cellule dendritique en migration montrant une accumulation d'actine à l'arrière de la cellule et au niveau du noyau au passage de la constriction (Thiam et al., 2016). (B) Dans des conditions de faible adhésion et de confinement, des cellules mésenchymateuses peuvent spontanément adopter un phénotype amiboïde (Liu et al., 2015)

### 2.2.3 Influence de la rigidité du substrat sur la migration

La déformabilité physique de l'environnement, ou rigidité, varie énormément en fonction des différents tissus. Il existe 8 ordres de grandeur entre le tissu le plus rigide, le tissu osseux ( $10^9$  Pa) et le tissu le plus mou, le tissu cérébral (100 Pa) (Figure 13A). Certaines variations de rigidité sont d'ailleurs utilisées en diagnostics cliniques pour déceler par palpation des tumeurs par exemple. Enfin, il est connu depuis longtemps que la plupart des cellules issues de tissus sains ne survivent pas en suspension et ont besoin d'un support solide pour se développer *in vitro*. L'absence d'interaction entre les cellules et la matrice extracellulaire provoque une mort cellulaire apoptotique appelée anoïkose (anoikis) (Frisch and Francis, 1994). En biologie, cette notion de rigidité extracellulaire et son importance dans les processus cellulaires physiologiques et pathologiques sont restés peu pris en compte jusqu'aux années 2000. A présent, elle fait l'objet de nombreuses études, notamment grâce à l'essor de surfaces aux rigidités contrôlables et modulables, plus physiologiques que les surfaces classiques de culture, en verre ou en plastique, très rigides. Ainsi, il existe un certain nombre de matrices synthétiques dont la rigidité peut être contrôlée incluant des films de silicone déformable (PDMS) et des gels, de polyacrylamide ou polyéthylène-glycols.

Les cellules détectent la rigidité de la matrice extracellulaire, via un mécanisme de mécanotransduction, que nous avons déjà évoqué précédemment, et dont nous allons rapidement rappeler le principe. Les complexes d'adhésion liés aux intégrines sont les premiers senseurs mécaniques de la cellule. Au sein d'une cellule adhérant à son substrat, les forces générées sur les adhésions par les câbles d'acto-myosine qui parcourent la cellule engendrent une tension interne isométrique ou asymétrique si certaines adhésions se détachent. L'application de forces sur les complexes d'adhésion entraîne un changement de conformation de certaines protéines au sein de ces complexes. Ceci va permettre le recrutement de protéines de signalisation qui, par une série de boucles de rétroaction positives, activent et augmentent l'activité contractile de l'acto-myosine. Ce mécanisme permet à la cellule d'adapter le niveau des forces générées à celles nécessaires pour déformer la matrice extracellulaire (Charras and Sahai, 2014).

Les forces mécaniques appliquées à la surface cellulaire au niveau des intégrines activent non seulement des voies de signalisation à partir de la membrane, mais elles provoquent également des réarrangements structuraux dans le cytoplasme et le noyau (Maniotis et al., 1997). Les forces mécaniques appliquées à la surface cellulaire peuvent ainsi agir à distance et être converties en signal mécano-chimique directement dans le noyau. En effet, l'enveloppe nucléaire est directement connectée au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire du complexe LINC (« linker of nucleoskeleton and cytoskeleton ») et Nesprine. La déformation de l'enveloppe nucléaire induite par une force

appliquée à la surface de la cellule stimule notamment une entrée de calcium à travers des canaux ioniques nucléaires, ce qui induit l'expression de certains gènes. L'identité de ces canaux nucléaires mécano-sensibles est encore inconnue, mais ceux-ci sont certainement liés aux protéines de structures du noyau (Wang et al., 2009).

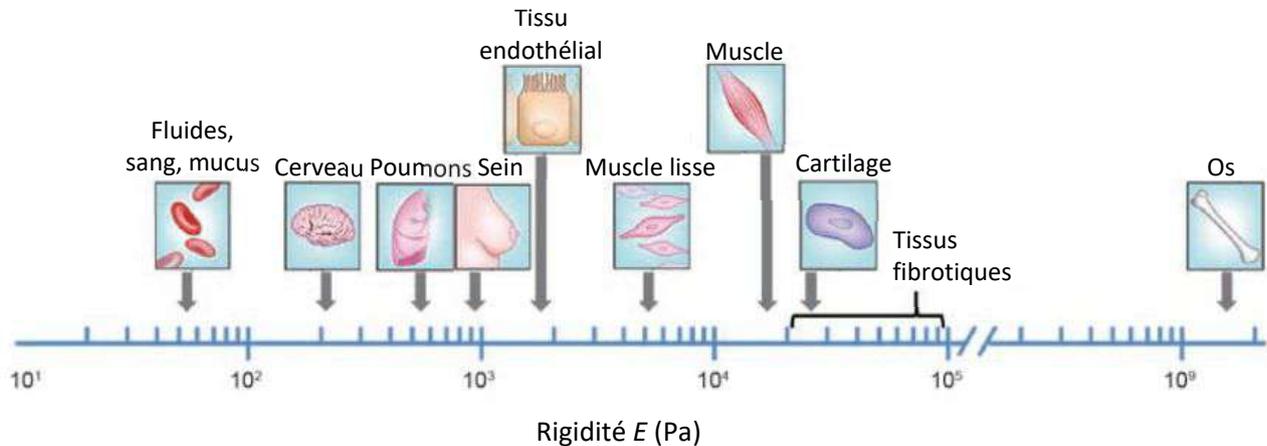
Outre la détection des propriétés mécaniques globales du substrat (rigide ou mou), les cellules sont également capables de déterminer la rigidité locale de leur environnement et ses potentielles variations à l'échelle de la cellule. Ce mécanisme leur permet ainsi de s'orienter en réponse à un gradient de rigidité en migrant vers les zones plus rigides, un processus appelé durotaxie (Lo et al., 2000) (Figure 13B). Cette capacité implique une forte résolution spatiale quant à la détection des propriétés mécaniques de la matrice à l'échelle submicrométrique. Les câbles d'acto-myosine qui se déploient d'un bout à l'autre de la cellule ne sont pas capables de détecter si le substrat est plus rigide d'un côté ou l'autre de la cellule. Une forêt de piliers très fins (0,5 à 2 $\mu$ m de diamètre) peut être utilisée pour mesurer précisément les forces cellulaires locales et a permis de montrer l'existence de contractions micrométriques qui pourraient être utilisées comme senseurs locaux de la rigidité (Ghassemi et al., 2012).

De manière générale, les cellules sur des substrats rigides établissent des adhésions larges et stables avec le substrat, et adoptent une morphologie plus étalée (Guo et al., 2006; Pelham and Wang, 1997) (Figure 13C). Dans ce contexte, de larges fibres de stress concomitantes à l'étalement cellulaire sont observées, et les forces générées par les cellules sur le substrat sont importantes (Yeung et al., 2005). Les vitesses de migration tendent à diminuer avec l'augmentation de rigidité du substrat (Pelham and Wang, 1997). Néanmoins, on observe pour un certain nombre de cellules (comme les cellules musculaires lisses, les ostéoblastes ou les neutrophiles) qu'une vitesse optimale est atteinte à des rigidités intermédiaires (Khatiwala et al., 2006; Peyton and Putnam, 2005; Stroka and Aranda-Espinoza, 2009).

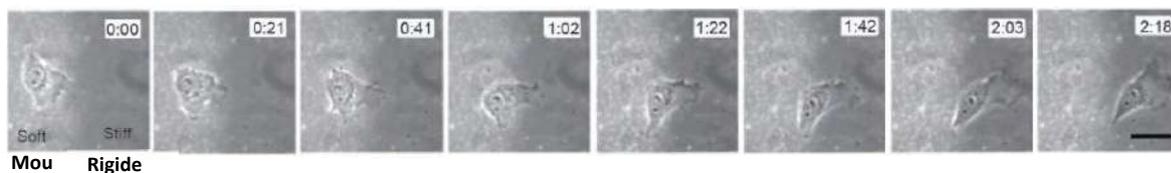
La rigidité du substrat influence également la pousse axonale et le branchement des neurones, avec néanmoins des différences de réponse selon le type neuronal. Ce phénomène a été particulièrement étudié pour les axones des neurones de ganglions rachidiens (« DRG neurons »). Balgude et al. montrent une diminution de leur taux d'extension neuritiques dans des gels d'agarose rigides (Balgude et al., 2001). Sur ces mêmes neurones, Yu et Bellamkonda ont étudié le passage de neurites à la frontière entre deux gels de rigidités différentes et observent également une diminution de l'extension sur des gels de rigidités supérieures à 210 Pa (Yu and Bellamkonda, 2001). L'influence de la rigidité du substrat sur le branchement axonal semble elle dépendre du type cellulaire : Flanagan et al. observent sur des neurones de moëlle épinière de souris une augmentation du branchement neuritique sur des substrats

mous (Flanagan et al., 2002). A l'inverse, Leach et al. montrent que des neurones PC12 étendent des prolongements plus longs et plus branchés sur des substrats rigides ( $10^2$ - $10^4$  Pa) (Leach et al., 2007). Les mécanismes sous-jacents à ces observations restent peu compris.

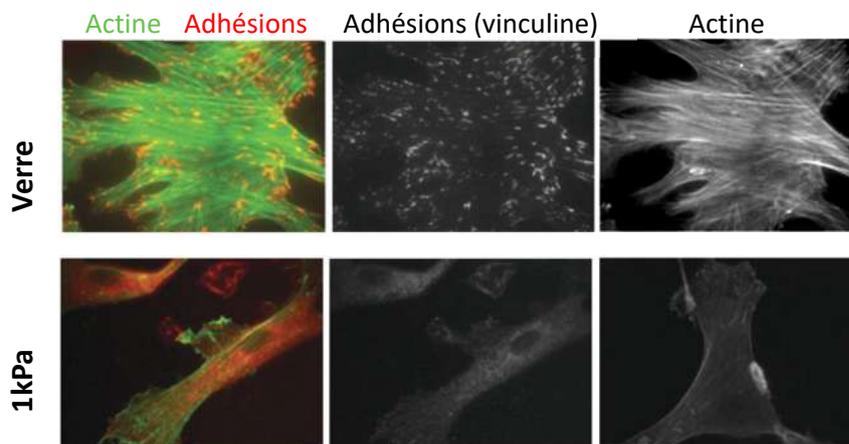
### A Rigidité de différents tissus d'un organisme



### B Phénomène de durotaxis



### C Organisation du cytosquelette sur des substrats de différentes rigidités



### Figure 13 | Influence de la rigidité du substrat sur la migration cellulaire

(A) Illustration de la diversité des rigidités des différents tissus d'un organisme humain.  $E$  représente le module de Young encore appelé module d'élasticité et est exprimé en Pascal (Yang et al., 2017) (B) Fibroblaste migrant du côté mou vers le côté rigide d'un gel de polyacrylamide, un phénomène appelé durotaxis. Echelle 40 µm (Lo et al., 2000) (C) Sur un substrat rigide, la cellule établit de larges adhésions avec le substrat et de nombreuses fibres de stress, à l'inverse d'un substrat plus mou où les adhésions sont plus petites et dynamiques (Peyton and Putnam, 2005).

### 2.3 Topographie et guidage par contact

La première mention de l'importance d'un substrat physique pour l'extension et le mouvement cellulaire remonte au début du XXe siècle, quand le scientifique Ross Granville Harrison remarque que des cellules embryonnaires de grenouille cultivées sur des fibres de toile d'araignée adaptent leur forme et leur mouvement aux fibres (Harrison, 1914) (Figure 14B). Plus tard, en 1934, Paul Weiss apporte les premières preuves d'un guidage axonal par des structures topographiques. En particulier, il remarque que les axones s'alignent le long de tranchées parallèles formées par « brossage » de sang coagulé sur une lamelle de verre (Weiss, 1934). Ce phénomène est alors nommé guidage par contact (« contact guidance »). Dès 1947, Weiss considère le guidage par contact comme une condition nécessaire pour un mouvement cellulaire dirigé (Weiss, 1947). Curtis et Varde reproduisent ces observations en cultivant des fibroblastes de cœur d'embryons de poulet sur des fibres (Curtis and Varde, 1964). A partir des années 80, la collaboration entre Adam Curtis et Chris Wilkinson, un ingénieur en électronique s'intéressant à la miniaturisation, popularise la discipline et les exemples de guidage par la topographie s'accumulent (Curtis and Wilkinson, 1997).

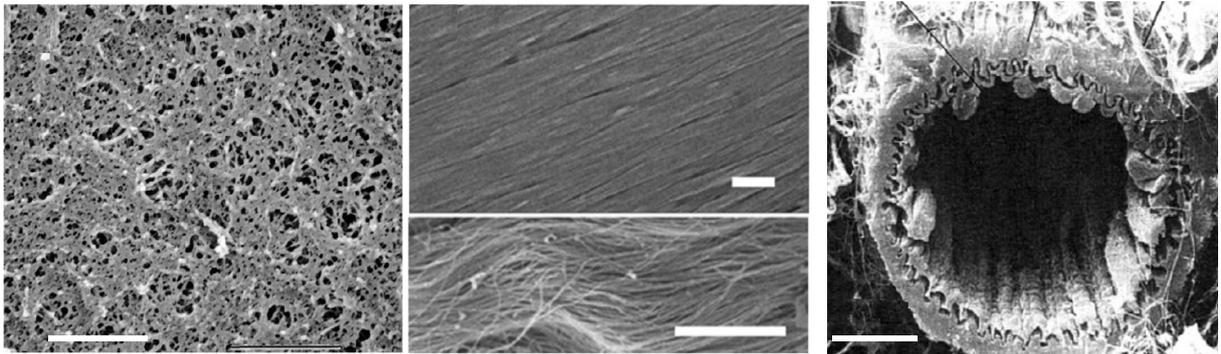
Depuis 20 ans, le développement des techniques de microfabrication issues de la microélectronique rend de plus en plus facile et accessible la fabrication de supports de cultures cellulaires micro ou nano structurés. De nombreuses études ont ainsi confirmé l'importance de la topographie de l'environnement sur un grand nombre de processus cellulaires comme la migration, ou encore l'adhésion, la prolifération et la différenciation.

*In vivo*, la topographie du microenvironnement cellulaire résulte d'un arrangement complexe entre protéines de la matrice extracellulaire et divers éléments cellulaires, et peut donc être très variable (Figure 14A). Par exemple, les fibres de collagène présentes dans la matrice dont le diamètre varie de 20 à 200nm peuvent former des arrangements organisés à l'échelle micrométrique. Les membranes basales à l'interface entre les épithéliums et les tissus conjonctifs sont un autre exemple de superstructure dérivée de matrice extracellulaire dont l'analyse en microscopie électronique révèle une nanostructure 3D composée de nanofibres réticulées et nanopores (Abrams et al., 2000) (Figure 14A). A l'opposé de cet arrangement non organisé, certains tissus comme le myocarde cardiaque ou la surface interne des vaisseaux sanguins montrent une matrice très organisée avec des structures alignées (Kim et al., 2010) (Figure 14A).

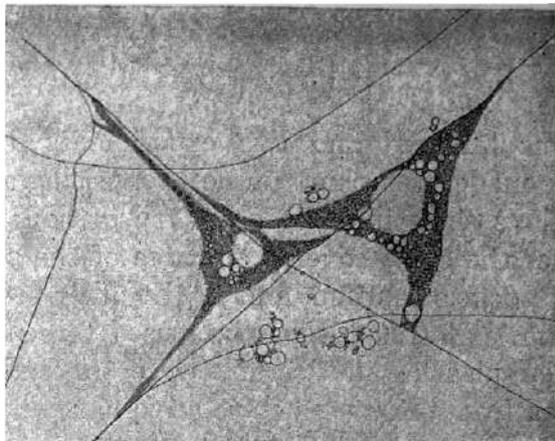
La diversité des architectures observées *in vivo* a donné lieu *in vitro* à une variété de formes, taille et distribution de structures topographiques synthétiques (Figure 14C). Parmi tous ces paramètres, la taille des structures semble jouer un rôle important dans la modulation des réponses cellulaires, et impacte

tous les types cellulaires étudiés. La topographie à l'échelle du micromètre et plus (soit l'ordre de grandeur d'une cellule) a principalement des effets sur la morphologie cellulaire tandis que les structures nanométriques impliquent des processus de détection subcellulaires. Un lien entre la taille de la topographie et celle des structures cellulaires d'exploration impliquées est d'ailleurs observé dans un certain nombre d'études. De manière générale, on peut identifier une taille de structures topographiques qui maximise les différentes réponses cellulaires, que nous allons maintenant détailler.

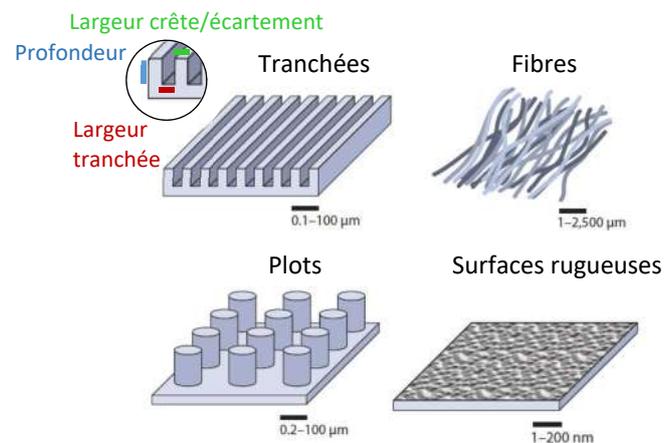
### A Exemples de topographies présentes *in vivo*



### B Guidage par contact, Harrison 1914



### C Topographies utilisées *in vitro*



### Figure 14 | Topographie du microenvironnement *in vivo* et *in vitro*

(A) Structures topographiques de différents tissus. Gauche : image en microscopie électronique à balayage (MEB) de la membrane basale de cornée d'un macaque. Echelle 500nm (Abrams et al., 2000). Milieu : image en MEB d'un myocarde de rat adulte. Echelle 10 $\mu$ m (Kim et al., 2010). Droite : Image en MEB de la surface interne d'un vaisseau sanguin. Echelle 10 $\mu$ m (Nguyen et al., 2016) (B) Première illustration du guidage par contact : Harrison observe que des cellules embryonnaires de grenouille en culture ne s'étendent que sur les fibres de toile d'araignées (Harrison, 1914) (C) Exemples de types de topographies artificielles présentées aux cellules (Hoffman-Kim et al., 2010)

### 2.3.1 Effet de la topographie sur l'adhésion cellulaire

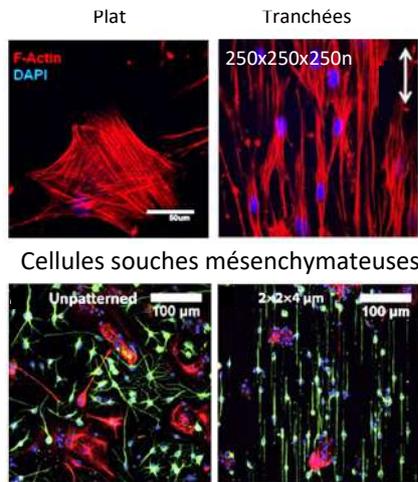
Des surfaces rugueuses ont été utilisées comme un modèle simple pour étudier l'influence de la topographie sur l'adhésion cellulaire (Figure 14C). En utilisant ce type de système, Khan et al. ont étudié l'attachement de neurones corticaux de rats et démontré l'existence d'une rugosité optimale de l'ordre de 60nm (Khan et al., 2005). De la même manière, une densité critique de 50-140 nanoparticules/ $\mu\text{m}^2$  promeut l'adhésion de fibroblastes (Goreham et al., 2013). A l'échelle micrométrique, l'adhésion de fibroblastes cultivés sur des cratères de 1 $\mu\text{m}$  de diamètre et 350 nm de profondeur est également dépendante de la densité des cratères (écartement compris entre 2 et 8 $\mu\text{m}$ ), avec un nombre de fibroblastes attachés plus important pour l'écartement le plus large (Jeon et al., 2015).

### 2.3.2 Effet de la topographie sur la morphologie et l'alignement cellulaire

Des rangées de micro ou nano-rainures de différentes dimensions et écartements est un modèle classique et largement utilisé pour lequel de multiples types cellulaires montrent un alignement parallèlement aux rainures (voir tableau récapitulatif 1 en annexe 1 et Figure 15). Un grand nombre d'études ont montré que le degré d'alignement était dépendant des différentes dimensions des tranchées (voir Figure 14C pour la nomenclature). Sur une série de rainures profondes de 5 $\mu\text{m}$ , Charest et al. montrent que l'alignement de myoblastes est optimal pour des tranchées de largeur et d'écartement de 10 $\mu\text{m}$ , puis diminue quand ces dimensions augmentent (Charest et al., 2007) (Figure 15B). Une étude de Teixeira et al. quant à elle explore l'influence de la profondeur des tranchées et montre qu'avec un écartement fixé, plus la rainure est profonde et plus l'alignement de cellules épithéliales de cornée est prononcé (Teixeira et al., 2003). Certaines cellules comme les cellules épithéliales de cornée ou des neurites de xénopes apparaissent très sensibles à la topographie et répondent à des profondeurs de rainures de 14nm (Zhou et al., 2009). De manière intéressante, une autre étude de Teixeira et al. montre que des cellules épithéliales de cornée humaine répondent différemment à des rainures nanométriques et micrométriques. En particulier, les cellules changent d'orientation et passent d'un alignement parallèle à perpendiculaire à la direction des rainures quand leur écartement passe de 4 $\mu\text{m}$  à 400nm (Teixeira et al., 2006) (Figure 15C). Wong et al. ont quant à eux étudié l'effet d'un changement de rapport d'aspect (rapport entre la profondeur et la largeur d'une tranchée) sur l'alignement cellulaire, et montrent que les tranchées de rapport d'aspect plus important (0,6-1,4) induisent une plus forte élongation et alignement cellulaire que les faibles rapports d'aspect (0,035-0,35) (Figure 15D). De manière intéressante, la plus forte élongation cellulaire est observée pour un rapport d'aspect pour lequel la largeur n'est pas la plus petite, ni la profondeur la plus importante (Wong et al., 2014). Cet effet du rapport d'aspect des structures a été observé de manière cohérente

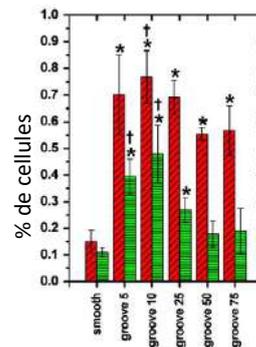
sur différents types cellulaires (Crouch et al., 2008), ce qui suggère que les phénomènes d'alignement et d'élongation liés au guidage par contact ne sont pas dépendants d'une seule dimension, et que les cellules sont capables d'intégrer une combinaison de différentes dimensions.

### A Alignement cellulaire dans la direction de micro ou nano tranchées

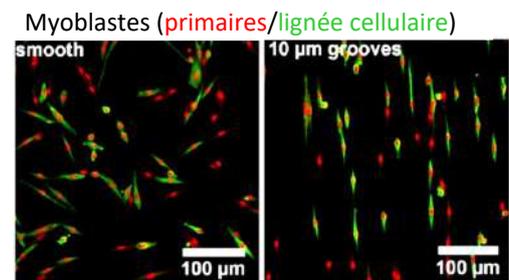


Progéniteurs de neurones d'hippocampe

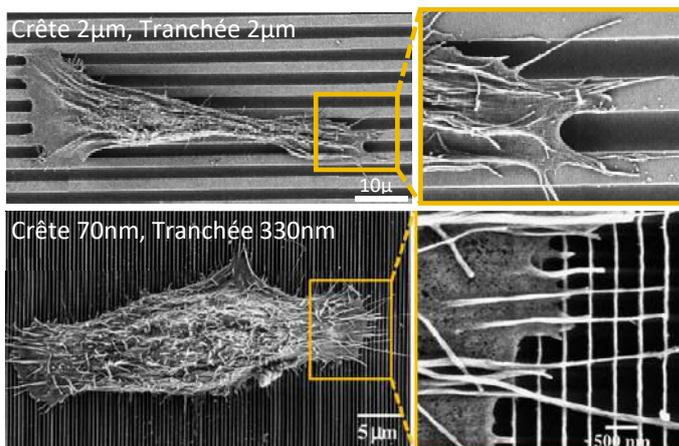
### B Influence de la largeur des tranchées



- Largeur des tranchées +

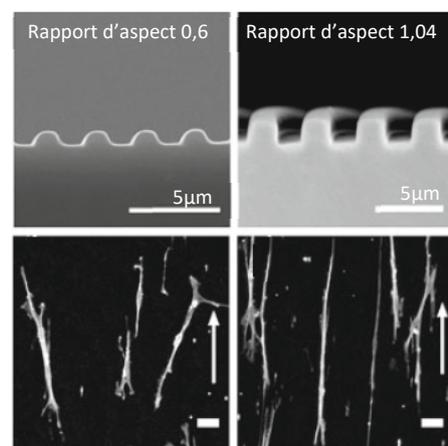


### C Influence de la dimension des structures



Cellules épithéliales de cornée humaine

### D Influence du rapport d'aspect



Cellules souches mésenchymateuses

## Figure 15 | Réponses cellulaires à un micro-relief de tranchées

(A) Exemples d'alignement cellulaire dans la direction des tranchées. Haut : cellules souches mésenchymateuses sur un substrat plat (gauche) ou sur des tranchées de profondeur, largeur et espacement 250nm. La flèche représente la direction des tranchées. Echelle 50µm (Teo et al., 2013). Bas : alignement de progéniteurs de neurones d'hippocampe après 2 semaines de culture sur un substrat plat (gauche) ou sur des tranchées de profondeur 4µm, largeur et espacement 2µm. Echelle 100µm (Chua et al., 2014) (B) Influence de la largeur des tranchées sur l'alignement de myoblastes : l'alignement est optimal pour une largeur de 10µm, puis diminue quand la largeur augmente (Charest et al., 2007) (C) Des cellules épithéliales de cornée humaine sur des tranchées de profondeur 600nm, largeur 2µm et espacement 2µm s'alignent dans la direction des tranchées. L'alignement devient perpendiculaire sur des tranchées de profondeur 600nm, largeur 330nm et espacement 70nm (Teixeira et al., 2006) (D) Influence du rapport d'aspect (ratio entre la profondeur et la largeur d'une tranchée) sur l'alignement de cellules souches mésenchymateuses : un rapport d'aspect proche de 1 maximise l'alignement. Echelle (bas) 50µm (Wong et al., 2014).

L'élongation cellulaire en réponse au relief n'a pas été seulement observée sur une topographie de rainures. Des cellules souches mésenchymateuses humaines cultivées sur des nanotubes de dioxyde de titane montrent une morphologie plus allongée sur les tubes de plus grand diamètre (70-100nm) (Oh et al., 2009). De la même manière, des fibres générées par électrofilage (« electrospinning ») promeuvent l'alignement de fibroblastes, particulièrement pour les fibres de grand diamètre (environ 740nm) (Chaurey et al., 2012). L'alignement de ces fibres augmente de plus l'alignement cellulaire et l'efficacité de la recolonisation d'une blessure dans une expérience de « scratch assay » *in vitro* (Patel et al., 2007).

### 2.3.3 Effet de la topographie sur la migration cellulaire

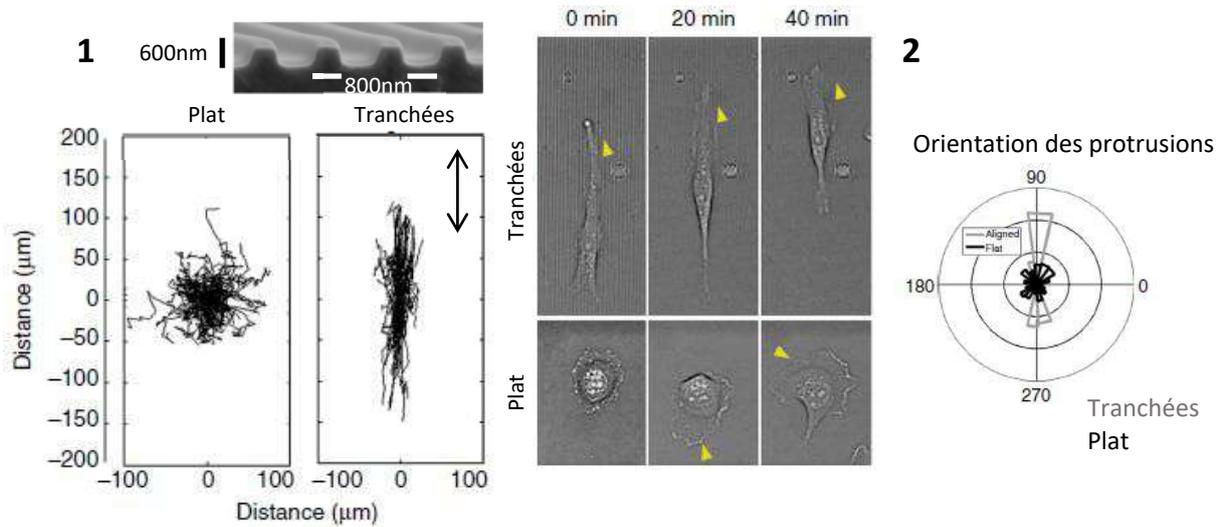
La topographie de l'environnement extracellulaire a également une forte influence sur la migration cellulaire. Une augmentation de la motilité a été observée pour un certain nombre de types cellulaires cultivés sur des substrats micro et nanostructurés (Brammer et al., 2008; Liliensiek et al., 2010; Mello et al., 2003). C'est notamment le cas des neutrophiles qui migrent plus rapidement sur des surfaces creusées de rainures que sur des surfaces planes (Tan and Saltzman, 2002). A l'inverse d'une surface plane où les trajectoires cellulaires sont aléatoires, des cellules épithéliales de cornée migrent dans la direction de rainures de taille nanométrique (Diehl et al., 2005). Ce résultat a été reproduit sur un grand nombre de types cellulaires (Dalton et al., 2001; Gasiorowski et al., 2010; Lenhert et al., 2005; Ray et al., 2017; Tang et al., 2015), avec des variations selon les cellules et les dimensions des tranchées (Biela et al., 2009) (Figure 16A). La migration dans la direction des tranchées conduit ainsi à un mouvement cellulaire plus directionnel, qui s'accompagne d'une polarisation plus rapide dans une expérience de cicatrisation sur des cellules musculaires lisses (Yim et al., 2005). Quelques études ont étudié d'autres types de topographie : sur un substrat de piliers (10 $\mu$ m de diamètre, 2 $\mu$ m de haut, séparés de 16 $\mu$ m), des fibroblastes montrent une vitesse de migration augmentée, mais une directionnalité diminuée associée à un mouvement en zig-zag et une morphologie plus branchée (Frey et al., 2006). Ghibaud et al. observent également des morphologies cellulaires globalement plus branchées sur un substrat de piliers (hauteur 2 à 10 $\mu$ m, diamètre 5 à 10 $\mu$ m, espacement 5 à 10 $\mu$ m). En revanche, les cellules en migration entre et sur les piliers montrent des vitesses réduites, mais une persistance de direction plus importante que sur des surfaces planes. Cette directionnalité est particulièrement forte quand les cellules migrent sur les piliers faiblement espacés, où ils étendent des protrusions fines et longues (Ghibaud et al., 2009).

La migration cellulaire est également influencée par des variations dans la densité des indices topographiques. Ainsi Kim et al. ont utilisé des surfaces avec un gradient de densité de rainures (plus ou moins écartées), et montrent que les fibroblastes sont plus alignés et polarisés dans la direction des

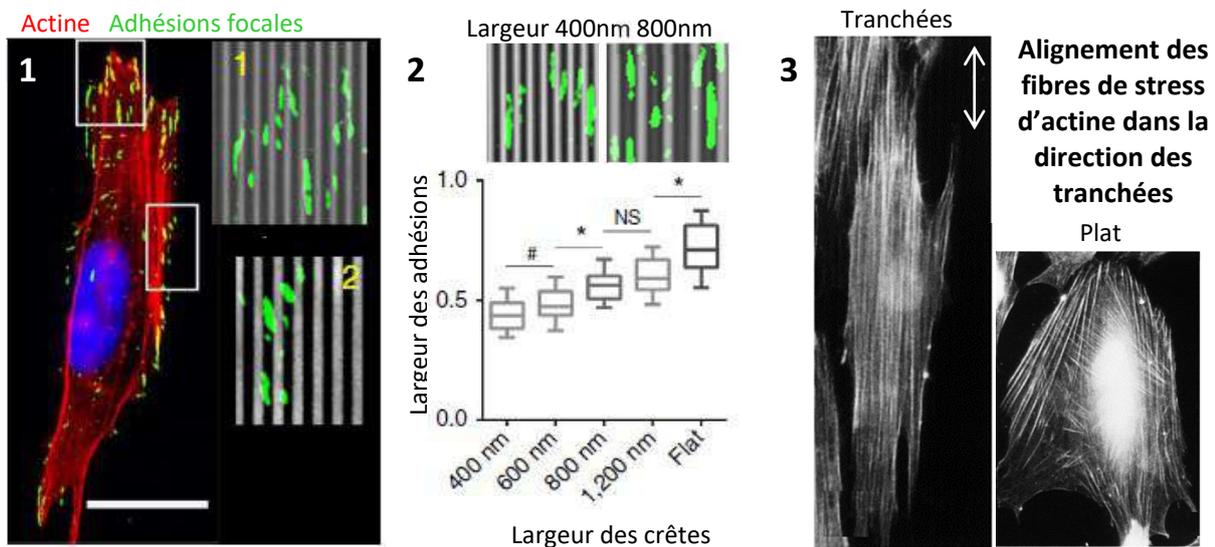
rainures dans les régions où elles sont plus rapprochées. En revanche, une dépendance biphasique entre la vitesse de migration de fibroblastes et l'écartement entre les rainures est observée, avec les vitesses de migration les plus importantes (40µm/h) mesurées dans les zones de densités intermédiaires. L'analyse des trajectoires cellulaires montre que les cellules ont tendance à se déplacer dans la direction des rainures, avec néanmoins un biais vers les régions moins denses pour les cellules situées sur les zones denses, et à l'inverse un biais vers les régions denses pour celles situées dans les régions peu denses (Kim et al., 2009b). Ces résultats indiquent que les cellules sont sensibles à des gradients de densité de structures topographiques. *In vivo*, cela peut avoir un impact sur des processus de cicatrisation au cours desquels les fibroblastes pourraient ainsi migrer vers les zones lésées où la matrice extracellulaire en cours de régénération montre une densité intermédiaire. Suivant cette idée, la même équipe a créé un substrat formé d'un maillage de structures de densités variables, d'orientations symétriques ou asymétriques, mimant la complexité physiologique des matrices extracellulaires. Sur ce substrat, les cellules migrent majoritairement vers les zones de plus fortes densités de structures. En outre, les cellules montrent une plus forte élongation dans les zones aux structures asymétriques, ce qui suggère que les cellules sont capables d'intégrer ces deux types d'informations spatiales (Kim et al., 2009a).

L'ensemble de ces résultats indiquent que la migration cellulaire est fortement influencée et guidée par la topographie du microenvironnement. Beaucoup de processus physiologiques tels la cicatrisation ou le déplacement de cellules immunitaires peuvent ainsi être impactés *in vivo*. Les implications sont également fortes dans des processus pathologiques, et notamment dans l'invasion tumorale. Il a été en effet montré qu'un certain nombre de cellules cancéreuses sont guidées par la topographie de leur environnement, ce qui augmente leur dissémination et leur potentiel invasif (Park et al., 2016; Provenzano et al., 2006, 2008).

## A Migration de cellules de carcinome sur des nano-tranchées



## B Organisation du cytosquelette en réponse à la topographie



## Figure 16 | Influence de la topographie sur la migration cellulaire et l'organisation du cytosquelette

(A) Migration de cellules de carcinomes sur des nano-tranchées : les cellules montrent un mouvement directionnel dans la direction des tranchées (1) associé à une élongation préférentielle des protrusions dans cette direction (2). (B) La topographie contraint l'élongation des adhésions focales sur les crêtes. Les adhésions non alignées sont plus rares et plus petites. Echelle  $20\mu\text{m}$  (1). La largeur des adhésions focales est corrélée à celle des crêtes. Sur des crêtes plus larges (800nm), les adhésions s'étendent également dans les tranchées (gris clair) (Ray et al., 2017) (2). Alignement des fibres de stress d'actine dans la direction des tranchées (flèche blanche. Largeur tranchée+crête  $4\mu\text{m}$ ) (3) (Teixeira et al., 2004).

### 2.3.4 Mécanismes intracellulaires impliqués

Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer les mécanismes sous-jacents à ce phénomène de guidage par contact comme par exemple la distribution sélective des protéines d'adhésion sur les surfaces microstructurées, l'organisation et l'alignement des complexes d'adhésion et du cytosquelette, ou encore la polarisation cellulaire résultant d'une distribution hétérogène de certains récepteurs et voies de signalisation associées.

On observe ainsi un effet général d'alignement du cytosquelette dans la direction de la topographie (en particulier pour un micro-relief de tranchées). Cet alignement a en particulier été noté pour les filaments d'actine et les adhésions focales à de nombreuses occasions (Biggs et al., 2008; Gerecht et al., 2007; Kim et al., 2009b, 2013; Lenhert et al., 2005; Matsuzaka et al., 2000; Ray et al., 2017; Tang et al., 2015; Teixeira et al., 2006; Teo et al., 2013; Wojciak-Stothard et al., 1995a) (Figure 16B). Ici encore, cet effet semble dépendre de la dimension des structures, et apparaît plus fort pour des structures étroites et denses (den Braber et al., 1998; Teixeira et al., 2004; Teo et al., 2013). Le réseau de microtubules, bien que moins étudié, s'oriente également selon l'axe d'élongation principale de la cellule (Biggs et al., 2008; Gerecht et al., 2007). Il a été proposé que l'alignement du cytosquelette, et en particulier des microtubules, est un état énergétiquement favorable et que les cellules chercheraient en s'alignant à la topographie à minimiser le degré de distorsion de ces structures. De manière intéressante, sur des fibroblastes cultivés sur un substrat de rainures parallèles confrontés à une topographie d'orientation perpendiculaire, on observe néanmoins que les microtubules s'adaptent précisément à la nouvelle orientation tandis que les microfilaments d'actine restent rectilignes selon une direction, et s'interrompent lorsque la topographie change d'orientation (Hamilton et al., 2009).

La formation d'adhésions focales semble être pour de nombreuses cellules un élément important et initiateur de la réponse à la topographie. Le nombre, la taille et l'orientation des adhésions focales sont dépendants des dimensions et de la distribution des micro-tranchées. Schématiquement, les adhésions focales sur des rainures nanométriques ( $<1\mu\text{m}$ ) sont moins nombreuses, plus petites mais plus allongées que sur des structures micrométriques ( $1-10\mu\text{m}$ ) (Kim et al., 2013; Liu et al., 2009; Teixeira et al., 2004; Teo et al., 2013). De manière générale, les adhésions focales s'assemblent et s'allongent sur ou le long des crêtes (Biggs et al., 2008; den Braber et al., 1998; Kim et al., 2009b, 2013; Matsuzaka et al., 2000; Tang et al., 2015). On peut par ailleurs observer une corrélation intéressante entre la largeur des structures topographiques et celle des adhésions focales (Ray et al., 2017; Teixeira et al., 2003, 2006) (Figure 16B). Ray et al. ont observé de manière dynamique la formation des adhésions focales sur des cellules de carcinome cultivées sur des nano-tranchées et observent la disparition des adhésions initialement petites et d'orientation aléatoire au profit d'adhésions qui s'allongent rapidement dans la

direction des tranchées (Figure 16B). Les auteurs proposent que cette contrainte spatiale par la topographie sur l'élongation des adhésions conduit à la génération de forces de tractions anisotropiques par les câbles d'actine qui y sont associés, et finalement à un mouvement cellulaire directionnel dans la direction du relief. Ainsi, le relâchement des contraintes spatiales sur les adhésions (par l'augmentation de l'espacement des tranchées), ou l'utilisation de roténone (une drogue qui limite la taille des adhésions) altèrent l'alignement et la directionnalité cellulaire dans la direction des tranchées (Ray et al., 2017). Une étude de Frey et al. soutient ce rôle important des adhésions et montre que la kinase FAK présente aux adhésions focales est essentielle pour la réponse à la topographie de fibroblastes. En effet, des fibroblastes FAK<sup>-/-</sup> perdent la réponse à la topographie et adoptent un comportement similaire à celui observé sur une surface plane. Les auteurs proposent que l'augmentation de surface de contact générée par les indices topographiques guide la migration par la stabilisation des adhésions et la génération de contractions au niveau des structures, par un mécanisme dépendant de FAK et de la myosine II (Frey et al., 2006). Associé aux adhésions, le réseau d'acto-myosine joue un rôle important dans la réponse au relief : l'application de drogues perturbant le réseau d'actine (cytochalasine D et latrunculine B) ou la myosine (blebbistatine) abolit l'alignement et la migration directionnelle induite par la topographie (Gerecht et al., 2007; Kwon et al., 2012; Teo et al., 2013).

Néanmoins, le degré d'implication des différentes structures du cytosquelette ainsi que la séquence d'événements menant à sa réorganisation en réponse à la topographie restent flous et sujets à débat. L'étude de Wojciak-Stothard note bien un rôle prépondérant du système d'actine, qui se concentre au voisinage des structures, 5 minutes après l'attachement des cellules au substrat, suivi plus tard par une réorganisation des microtubules (Wojciak-Stothard et al., 1995b). Ces travaux vont néanmoins à l'encontre de ceux d'Oakley et Brunette qui montrent sur des fibroblastes que les microtubules sont les premiers éléments à s'orienter parallèlement aux tranchées, suivis par les microfilaments d'actine puis les adhésions focales (Oakley and Brunette, 1993). Wojciak-Stothard note également que si l'application de drogues perturbant l'actine diminue l'alignement cellulaire, la dépolymérisation des microtubules par la colcémide provoque le même effet, tandis que leur stabilisation par le taxol tend à renforcer l'orientation des cellules dans la direction des tranchées (Wojciak-Stothard et al., 1995b). Finalement, l'observation que les traitements pharmacologiques contre les différentes structures du cytosquelette n'abolissent jamais totalement la réponse au relief indique qu'aucun de ces éléments seul n'a un rôle crucial dans le guidage par contact. De la même manière, Teixeira et al. quant à eux observent un alignement de cellules épithéliales de cornée sans alignement des adhésions focales et des filaments d'actine, et démentent ainsi l'implication de ces structures dans la mise en place de la réponse au relief. Ils soutiennent plutôt un rôle des lamellipodes et filopodes dans la génération de forces anisotropiques et du guidage par contact (Teixeira et al., 2003).

En effet, il a également été proposé que le relief induise des contraintes spatiales sur les structures membranaires exploratrices de la cellule, favorisant l'élongation de protrusions dans la direction de tranchées et limitant leur extension latérale dans d'autres directions, un processus à la base de la migration directionnelle comme nous l'avons déjà vu auparavant (Ray et al., 2017) (Figure 16A). Mai et al. montrent qu'en présence d'une topographie combinant différentes orientations contradictoires, la cellule est capable de s'aligner selon la composante la plus longue du patron. En revanche, en présence de blebbistatine ou de Y27632 (un inhibiteur de la myosine II et de la kinase Rho, respectivement), les cellules présentent des protrusions désynchronisées dans toutes les directions. Ces résultats suggèrent qu'en l'absence de la contractilité de l'acto-myosine, les cellules ne peuvent pas inhiber la polymérisation de l'actine dans les directions mineures et répondent donc seulement aux indices locaux sans coordination globale de l'orientation cellulaire (Mai et al., 2007). L'ensemble de ces résultats indique donc que la réponse à la topographie est un processus complexe, dynamique et actif impliquant une combinaison de facteurs.

Aujourd'hui, les mécanismes intracellulaires mis en jeu dans la réponse à la topographie restent flous. Il est tentant de supposer que la détection et la réponse à la topographie impliquent des mécanismes communs avec la mécanotransduction, comme le suggère l'implication des adhésions focales dans la réponse au relief. Néanmoins, très peu d'études ont encore exploré les mécanismes de signalisation impliqués dans ce processus. Il a été montré que RACK1 (receptor of activated protein kinase C) inhibe le guidage par contact sur des nanotranchées (Dalby et al., 2008). Chez des neurones d'hippocampe, les afflux de calcium et l'activité de la PKC (protein kinase C) régulent l'alignement des neurites le long de la topographie (Rajnicek and McCaig, 1997) tandis que la signalisation PI3 kinase est impliquée dans le guidage par contact de fibroblastes et cardiomyocytes (Au et al., 2007).

Différentes études se sont intéressées aux changements d'expression génétique en réponse à la topographie. Gasiorowski et al. montrent sur des cellules HUVEC (cellules endothéliales de veines ombilicales humaines) le changement d'expression de 3171 gènes entre des cellules cultivées sur un substrat plat ou un substrat de tranchées. Les auteurs observent en particulier une augmentation de l'expression de gènes liés aux modifications protéiques (similaire à l'augmentation de l'expression de gènes de synthèse protéique observée en réponse à un stress mécanique). Une diminution d'expression est observée pour les protéines liées au cycle cellulaire, ainsi que des protéines de la matrice extracellulaire comme les intégrines, collagène ou laminine. Il est ainsi possible que lorsque les cellules atteignent un état d'équilibre, attachées et guidées par la topographie, elles diminuent la production de protéines qui sinon constitueraient un support adhésif (Gasiorowski et al., 2010). Une hypothèse intéressante lie directement les changements d'expression génétique aux changements de morphologie cellulaire et les potentielles déformations du noyau associées à la topographie. Ainsi, les travaux de

Matthieu Piel montrent que dans un environnement confiné, la déformation du noyau peut entraîner la rupture de l'enveloppe nucléaire et le changement d'expression de certains gènes, liés notamment à la mécanotransduction (Le Berre et al., 2012; Raab et al., 2016). De la même manière, une étude récente de Elosegui-Artola et al. montre que la déformation nucléaire et l'étirement des pores nucléaires module l'entrée des régulateurs transcriptionnels YAP/TAZ dans le noyau (Elosegui-Artola et al., 2017).

### 2.3.5 Effet de la topographie sur le guidage axonal

Les neurones possèdent parmi les différents types cellulaires, une morphologie très spécifique et polarisée, avec un corps cellulaire d'une taille de l'ordre de la dizaine de  $\mu\text{m}$ , un réseau de dendrites d'un côté et de l'autre un axone qui peut atteindre des longueurs très importantes et un diamètre qui peut varier de  $0,01\mu\text{m}$  à  $20\mu\text{m}$ . Au bout de l'axone, le cône de croissance est la structure protrusive et exploratrice du neurone dont l'aire peut varier de  $10\mu\text{m}^2$  à  $800\mu\text{m}^2$ , et qui contient à la périphérie des extensions de type filopodes qui sont les plus petites structures contribuant au guidage axonal, de l'ordre de  $100\text{-}300\text{nm}$  de diamètre. De par la variété des types de structures cellulaires, de leur taille, et de leur relative indépendance les unes par rapport aux autres (l'axone et ses arborisations n'ont pas nécessairement le même comportement que le corps cellulaire), les neurones répondent de manière différente et spécifique à la topographie. La réponse des neurones à la topographie a été étudiée par l'analyse de différents paramètres dynamiques et morphologiques tels que la vitesse de croissance, l'alignement et l'architecture/le branchement de l'arborisation axonale ou le nombre et la taille des neurites.

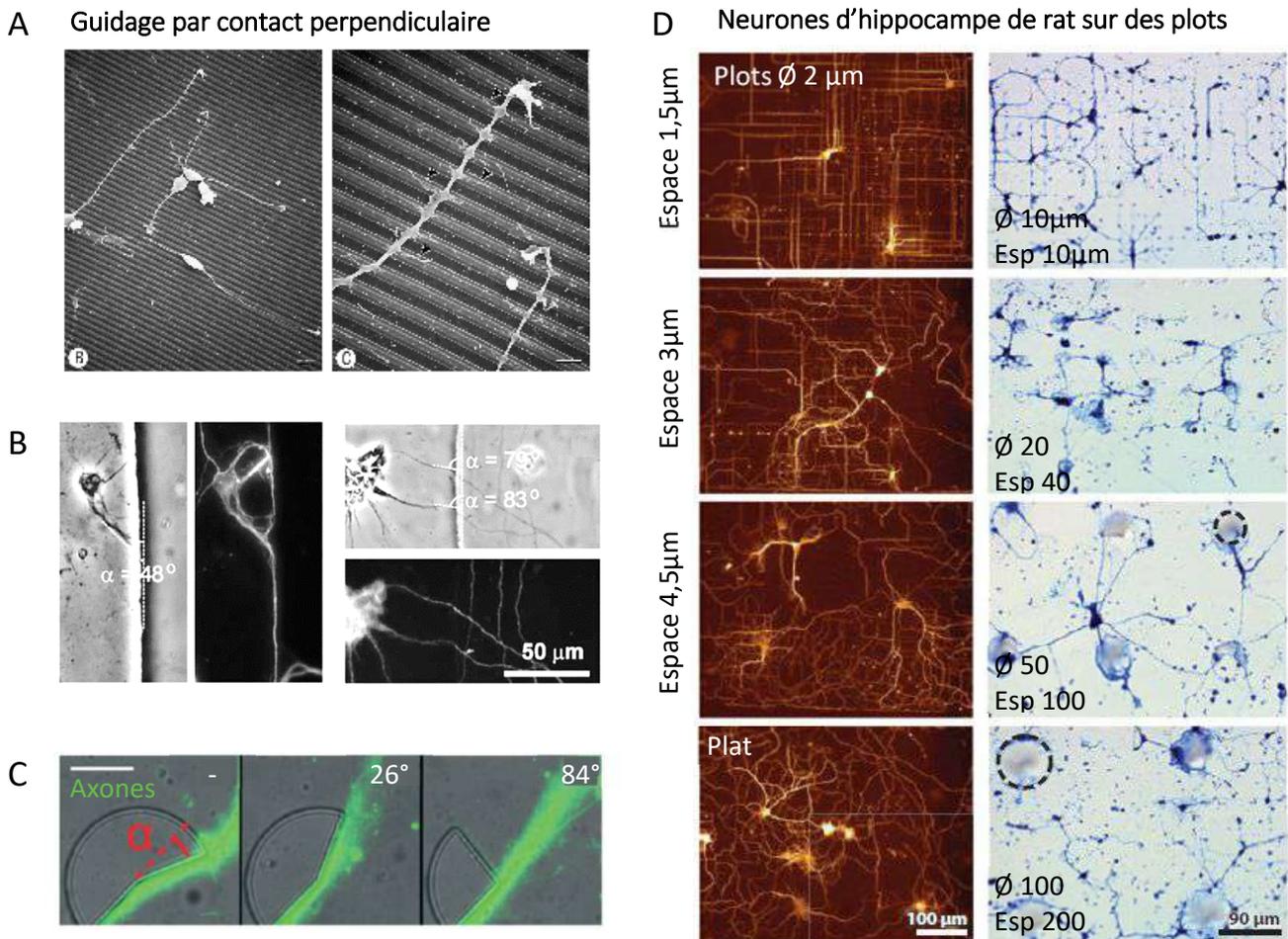
Un grand nombre d'études ont, comme pour les autres types cellulaires, utilisé un substrat creusé de rainures parallèles et observent un alignement des neurites dépendant des dimensions des structures (voir tableau récapitulatif en annexe 2). Cet alignement augmente avec la profondeur des tranchées (de  $0,2\mu\text{m}$  à  $4\mu\text{m}$ ), tandis qu'aucun effet n'est observé pour des structures inférieures à  $200\text{nm}$  (Clark et al., 1990; Miller et al., 2002). Des neurones de ganglions de la racine dorsale cultivés sur des tranchées micrométriques interagissent à la fois avec les tranchées et les crêtes. L'augmentation de la hauteur des tranchées amène à un alignement plus important des neurites et du corps cellulaire en les confinant soit au fond des tranchées, soit sur les plateaux (Miller et al., 2002). A hauteur fixée, la distance entre les rainures a également un effet sur l'alignement des neurites. Pour une hauteur de  $200\text{nm}$ , une augmentation de l'espacement de  $500$  à  $750\text{nm}$  réduit l'alignement de neurites de cellules PC12  $90\%$  à  $75\%$ . L'élongation du corps cellulaire est également plus importante pour l'espacement de  $500\text{nm}$  (Cecchini, 2008). Comme précédemment décrit, cette même équipe montre dans une étude ultérieure que la polarisation neuronale observée sur les nano-rainures est liée à des contraintes spatiales sur les adhésions focales, qui s'allongent et se stabilisent quand elles sont alignées avec la topographie (Ferrari

et al., 2010). Un alignement neuritique est également observé pour des structures micrométriques (tranchées de 2 à 10 $\mu\text{m}$  de profondeur et de 5 à 60 $\mu\text{m}$  de large). Néanmoins, l'alignement le plus fort reste observé pour les structures les plus petites (Mahoney et al., 2005; Yao et al., 2008).

Si la plupart des études rapportent un alignement parallèle à la direction des tranchées (comme c'est le cas pour la majorité des cellules), un guidage par contact dit « perpendiculaire » a également été observé pour des neuroblastes (Nagata et al., 1993) et des neurones d'hippocampe de rat (Gomez et al., 2007a; Rajnicek et al., 1997) (Figure 17A). Dans ces situations, les neurites franchissent plusieurs tranchées perpendiculairement à leur orientation plutôt que d'en suivre une unique. Ce processus dépend également des dimensions des structures. On peut schématiser en concluant que les neurites ont tendance à traverser des tranchées profondes et étroites et à suivre celles plus larges et peu profondes. Ce phénomène pourrait être lié à la combinaison du degré d'exploration et d'adhésion des filopodes à l'avant du cône de croissance et de la courbure maximum des neurites (Chua et al., 2014). De manière dynamique, il apparaît également que l'angle d'arrivée du cône de croissance détermine si les neurites tournent pour suivre la direction de l'indice topographique, ou la franchissent en gardant leur orientation de départ. Ainsi, à une hauteur fixée de 11 $\mu\text{m}$ , les neurites qui abordent perpendiculairement la tranchée ne modifient pas leur direction, tandis que celles arrivant plus parallèlement tournent pour s'engager dans la tranchée (Li and Folch, 2005) (Figure 17B). Sur ce même principe, Renault et al. observent que les axones en croissance s'appuient sur les bords de microcanaux. Face à un carrefour avec un changement de direction d'angle inférieur à 26°, les axones continuent à être guidés par le bord dans la direction divergente. En revanche, à partir de cet angle critique de 26°, les axones ignorent la bifurcation et continuent leur chemin sur une direction linéaire (Renault et al., 2016) (Figure 17C).

Des topographies isotropiques telles que des forêts de plots de différentes tailles ont également été proposées aux neurones. Les neurites suivent de manière très stéréotypée ces indices topographiques discrets. Des neurones hippocampiques cultivés sur des plots d'1 $\mu\text{m}$  de haut, de diamètres de 0,5 ou 2 $\mu\text{m}$  et espacés de 1,5 à 4,5 $\mu\text{m}$  s'alignent sur cette géométrie en naviguant entre les plots. En particulier, l'alignement et les tailles de neurites les plus importantes sont observées pour les piliers de diamètres 2 $\mu\text{m}$  et avec le plus petit espacement. L'alignement décroît quand l'espacement augmente, pour rejoindre les orientations aléatoires comme observé sur une surface plane à partir de 4,5 $\mu\text{m}$  entre les plots (Dowell-Mesfin et al., 2004) (Figure 17D). Une étude similaire utilise des plots de plus grandes dimensions (diamètre de 10 à 100 $\mu\text{m}$  et espacement de 10 à 200 $\mu\text{m}$ ) et montre que pour les substrats avec les plus petites dimensions, comme précédemment, les neurites tendent à suivre une direction linéaire de plots en plots, branchant occasionnellement dans la direction perpendiculaire. Plus les dimensions augmentent, plus l'orientation des neurites est aléatoire, accompagnée par un

enveloppement des plots par les neurites (Hanson et al., 2009) (Figure 17D). La culture de ces mêmes neurones cette fois sur des plots de taille nanométrique montre une plus forte élongation neuritique ainsi qu'une polarisation axonale accélérée sur les nano-plots comparée à une surface plane (Bugnicourt et al., 2014).



**Figure 17 | Influence de la topographie sur le guidage axonal**

(A) Les neurites en croissance montrent un guidage par contact parallèle et perpendiculaire à la direction des tranchées. Neurones corticaux de souris cultivés deux jours sur des tranchées de profondeur  $0,5\mu\text{m}$  et de largeur  $1\mu\text{m}$  (Nagata et al., 1993) (B) Le guidage des neurites par les tranchées (hauteur  $11\mu\text{m}$ ) dépend de leur angle d'arrivée : les neurites arrivant perpendiculairement à la tranchée la traversent et celles arrivant plus parallèlement la suivent (neurones corticaux de souris) (Li and Folch, 2005) (C) Face à un angle inférieur à  $26^\circ$ , les axones continuent à être guidés par le bord de la structure. En revanche, à partir cet angle critique de  $26^\circ$ , les axones ignorent la bifurcation et continuent leur chemin sur une direction linéaire (Renault et al., 2016) (D) Gauche: effet de plots de diamètre  $2\mu\text{m}$  et d'écartement croissant sur le guidage axonal. L'alignement maximal est obtenu pour le plus petit espacement ( $1,5\mu\text{m}$ ). L'orientation des neurites devient de plus en plus aléatoire quand l'espacement augmente (Dowell-Mesfin et al., 2004). Droite : neurones d'hippocampe de rat marqués au bleu de coomassie cultivés sur des plots de PDMS de diamètre  $\varnothing$  et d'espacement croissants. Le meilleur alignement est observé pour le diamètre et l'espacement le plus faible (Hanson et al., 2009).

Il est intéressant de constater qu'à l'inverse d'une majorité de types cellulaires qui répondent à des topographies globalement isotropiques par une réponse globale symétrique et des morphologies plutôt rondes, les neurones trouvent dans ces structures discrètes des points de contact qui leur permettent d'avancer progressivement (ou de brancher si un autre point de contact est assez près) ce qui conduit finalement à des arborisations neuritiques alignées et branchées. Ce type de guidage par « balises » discrètes (« guidepost ») se rapproche du guidage par contact perpendiculaire évoqué précédemment, et pourrait constituer un mécanisme spécifique de la réponse au relief des neurones et de leurs longs prolongements.

## 2.4 Compétition et intégration de différents signaux extracellulaires

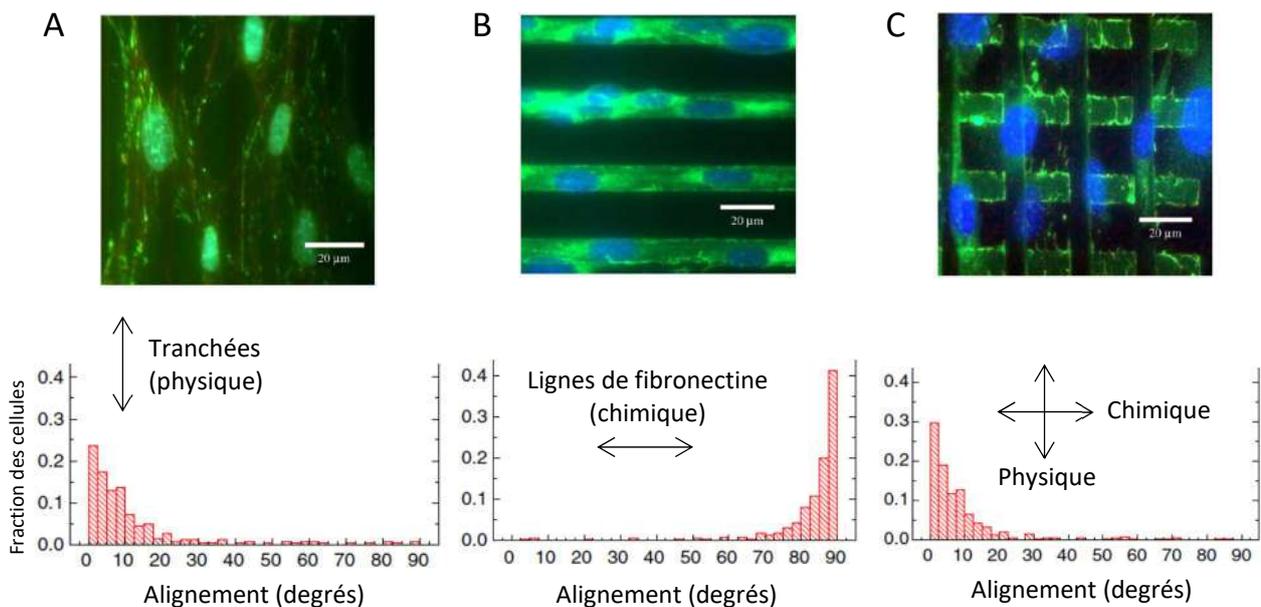
Dans leur environnement physiologique, les cellules naviguent dans un microenvironnement complexe et reçoivent simultanément une multitude de signaux de différentes natures, biochimiques et biophysiques. La façon dont ces différents indices agissent, de manière compétitive et/ou synergique reste très floue, et les résultats parfois contradictoires.

Une étude *in vitro* de Comelles et al. met soit en coopération, soit en compétition des indices topographiques de type « ratchets » et des gradients de fibronectine. Quand les deux types d'indices imposent la même direction, un biais augmenté dans la directionnalité des cellules est observé. En revanche, quand ils imposent une direction différente, la directionnalité globale est perdue, indiquant que la « force » de ces deux types d'indices était dans ce cas similaire (Comelles et al., 2014).

Sur des neurones d'hippocampe, les travaux de Gomez et al. montrent un effet différentiel sur la pousse axonale d'indices topographiques (tranchées de 1-2 $\mu$ m de large et 400-800nm de profondeur) et biochimiques, sous la forme de NGF (« nerve growth factor ») immobilisé au substrat. En particulier, les indices topographiques induisent un effet important sur la polarisation, indépendamment de la présence ou absence de NGF. En revanche, la longueur de l'axone est augmentée en présence de NGF et non de la topographie. De manière intéressante, la présence des deux types d'indices augmente de manière synergique la longueur axonale, ce qui est probablement dû à une polarisation rapide déclenchée par la topographie, associée à une croissance plus importante grâce au NGF (Gomez et al., 2007a). Dans une autre étude du même groupe, dans des conditions expérimentales proches, les indices topographiques (micro-canaux) placés d'un côté du neurone sont cette fois mis en compétition avec les indices biochimiques (NGF ou laminine) de l'autre côté. Dans 70% des cas, les indices topographiques sont préférés aux indices biochimiques et promeuvent la formation de l'axone (Gomez et al., 2007b).

L'étude de Charest et al. sur des ostéoblastes montre des résultats similaires : confrontés à des lignes de fibronectines superposées à des rainures d'orientation perpendiculaire, les cellules s'alignent préférentiellement dans la direction de la topographie (Charest et al., 2006) (Figure 18). Dans une autre étude à nouveau sur des neurones d'hippocampe, après avoir identifié une densité de plots optimale pour le guidage axonal, les auteurs appliquent un gradient attractif de Netrine-1 dans la direction de pousse préférentielle et montrent un effet synergique sur la croissance axonale avec un effet obtenu plus important que pour un gradient de Netrine-1 seul. A l'inverse, la présence de topographie est capable d'annuler l'effet répulsif d'un gradient de Semaphorine3A (Kundu et al., 2013).

De la même manière, les cellules répondent différemment à une circulation de fluide en présence ou non d'indices topographiques (Uttayarat et al., 2008), ou à des indices topographiques de rigidités variables par exemple (Park et al., 2012; Tzvetkova-Chevolleau et al., 2008). Toutes ces études indiquent que l'intégration de différents signaux extracellulaires implique des mécanismes complexes qu'il reste à élucider.



**Figure 18 | Compétition de différents indices extracellulaires contradictoires**

(A) Des ostéoblastes cultivés sur des tranchées (profondeur 4 $\mu$ m, largeur 8 $\mu$ m, espacement 16 $\mu$ m) s'alignent dans la direction des tranchées. (B) Cultivés sur des lignes adhésives de fibronectine (largeur 10 $\mu$ m, espacement 20 $\mu$ m), les ostéoblastes s'orientent sur les lignes. (C) Sur une combinaison des deux types d'indices (physique et chimique) d'orientations orthogonales, les cellules s'alignent préférentiellement le long des indices topographiques. Echelles 20 $\mu$ m (Charest et al., 2006).

Comme on a pu le voir dans ce chapitre, de nombreuses études ont cherché à comprendre et décrire les réponses cellulaires dans différents contextes topographiques. Dans un souci de synthèse, le lecteur pourra trouver en annexe à la fin de ce manuscrit des tableaux récapitulatifs des différents travaux cités et de leurs principaux résultats. Une multitude d'informations peut être tirée de ces études, mais le résultat principal qui en ressort est probablement celui d'un alignement et d'une migration orientée par la topographie (et en particulier par des tranchées), porté par un alignement du cytosquelette. On peut également retenir un effet important de la taille des structures topographiques sur les réponses cellulaires. De manière générale, des indices micrométriques semblent induire des réponses cellulaires globales, tandis que des structures nanométriques provoquent des réponses intracellulaires, en particulier via une action sur les complexes d'adhésions. Les futurs axes d'étude viseront notamment à approfondir la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse au relief, qui reste aujourd'hui superficielle. Un défi majeur est également de démontrer et transférer ces résultats *in vivo*, et de comprendre comment les différents indices extracellulaires sont perçus et intégrés par la cellule pour produire une réponse cellulaire cohérente et organisée.



---

## 3 La migration neuronale pendant le développement du cerveau

---

### Sommaire

---

#### **3.1 La migration cellulaire au cours du développement du système nerveux**

- 3.1.1 Généralités sur le cerveau et son développement
- 3.1.2 Place de la migration dans le développement du cerveau
- 3.1.3 Le cortex cérébral

#### **3.2 La migration radiale des neurones excitateurs du cortex**

#### **3.3 La migration tangentielle des interneurones corticaux**

- 3.3.1 Génération et spécification des interneurones dans les éminences ganglionnaires
- 3.3.2 Migration des interneurones jusqu'au cortex
- 3.3.3 Positionnement final et mise en place des circuits corticaux

#### **3.4 Pathologies associées à des défauts de migration des interneurones corticaux**

---

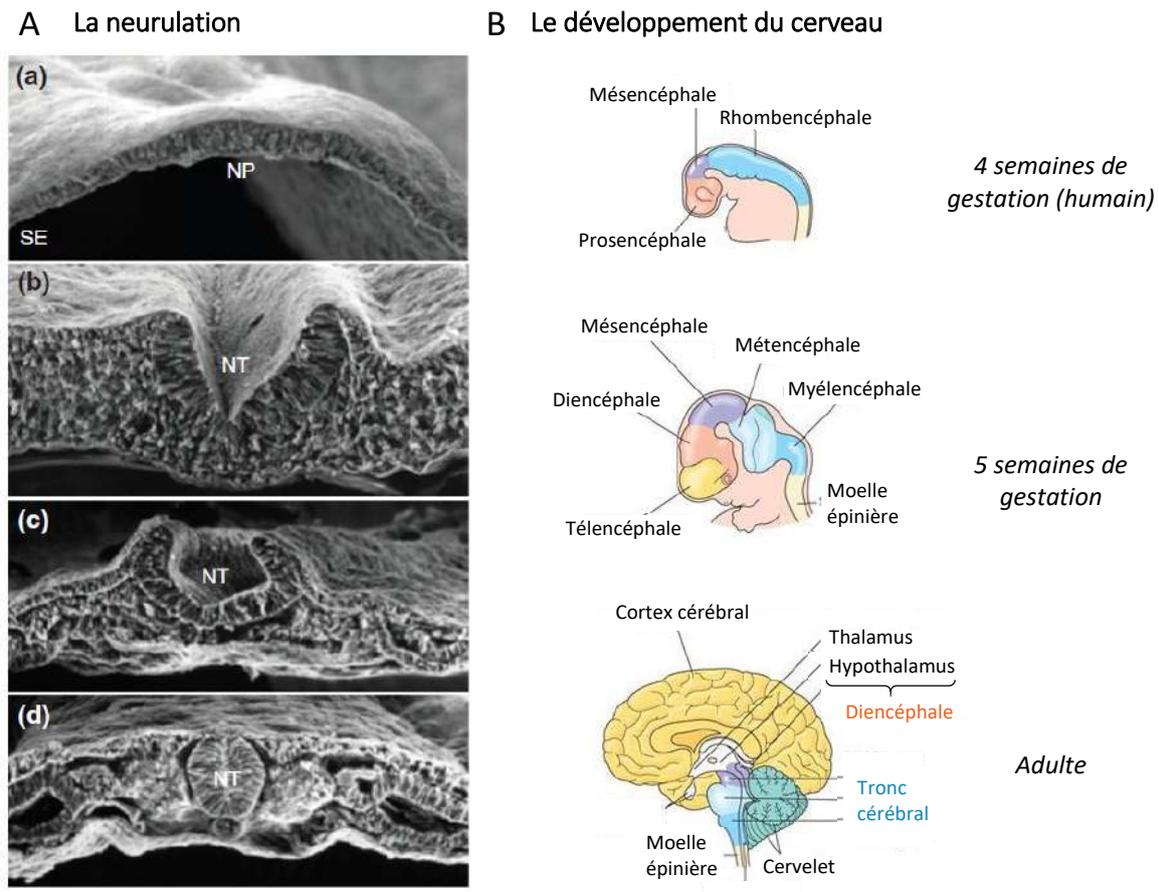
La migration des neurones embryonnaires est une étape cruciale pour le bon développement du cerveau et des circuits neuronaux. On se focalisera sur cette migration dans ce chapitre, et en particulier sur la longue migration des interneurones corticaux, qui composent avec les neurones excitateurs les circuits du cortex chez l'adulte. On soulignera finalement l'importance de cette migration en abordant les conséquences pathologiques liées à son dysfonctionnement.

## 3.1 La migration cellulaire pendant le développement du système nerveux

### 3.1.1 Généralités sur le cerveau et son développement

Le cerveau est l'organe le plus complexe et le plus fascinant de notre organisme. Il est composé d'environ 86 milliards de neurones, et autant de cellules gliales, organisés en réseaux complexes (un neurone contactant en moyenne 10000 autres neurones) (Herculano-Houzel, 2009). L'étude du cerveau a permis de distinguer des zones anatomiquement distinctes et spécialisées comme l'imagerie fonctionnelle a pu le mettre en évidence. Si on ne peut pas strictement associer une région à une fonction (qui met en souvent en jeu différentes zones), les différentes aires du cerveau sont néanmoins formées par des types de neurones, morphologiquement, physiologiquement, moléculairement et fonctionnellement distincts, et organisés selon différents patrons de connectivité.

Le développement du cerveau commence chez l'humain dès la troisième semaine de gestation, et se poursuit bien après la naissance. Rapidement après la fécondation, (à partir du 14<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire : E14-E16 chez l'humain, E6,5-E7,5 chez la souris), des mouvements cellulaires importants définissent et séparent trois feuillets embryonnaires : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme qui va donner naissance au système nerveux. Dans la partie dorsale de l'embryon, un épaissement de l'ectoderme forme la plaque neurale, à l'origine du tissu nerveux. L'invagination progressive de cette structure va finalement conduire à la fermeture et l'individualisation du tube neural (E24-E28 chez l'homme, E8,5-E10 chez la souris) (Figure 19A). La partie rostrale du tube neural, à l'origine de l'encéphale, va rapidement se développer et voir apparaître des constriction primaires qui définissent trois vésicules primitives : le prosencéphale ou cerveau antérieur, le mésencéphale ou cerveau médian, le rhombencéphale ou cerveau postérieur. Le reste du tube neural correspond à la future moelle épinière. Les trois vésicules primitives vont ensuite subir un certain nombre de mouvements morphogénétiques (courbures, plissements, etc.) et se différencier pour donner naissance aux cinq subdivisions encéphaliques, ébauches des principales divisions anatomiques du cerveau : le télencéphale, le diencephale, le mésencéphale, le métencéphale et de myélocéphale (Darnell and Gilbert, 2017; Stiles and Jernigan, 2010) (Figure 19B).



**Figure 19 | Le développement du cerveau chez les vertébrés**

(A) La fermeture du tube neural chez un embryon de poulet (microscopie électronique) (a) allongement des cellules de la plaque neurale (NP) (b) Invagination de la plaque neurale, formant une cavité (le futur tube neural NT) (c) Les bords du tube neural se rapprochent (d) Le tube neural se referme et s'individualise (Darnell and Gilbert, 2017) (B) Les principales étapes du développement du cerveau (humain). Le tube neural forme après sa fermeture trois vésicules primaires : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. Le prosencéphale se subdivise en télencéphale et diencéphale, le rhombencéphale en métencéphale et myélocéphale. La partie caudale du tube neural va générer la future moelle épinière. Adapté de (Singleton 2017).

### 3.1.2 Place de la migration dans le développement du cerveau

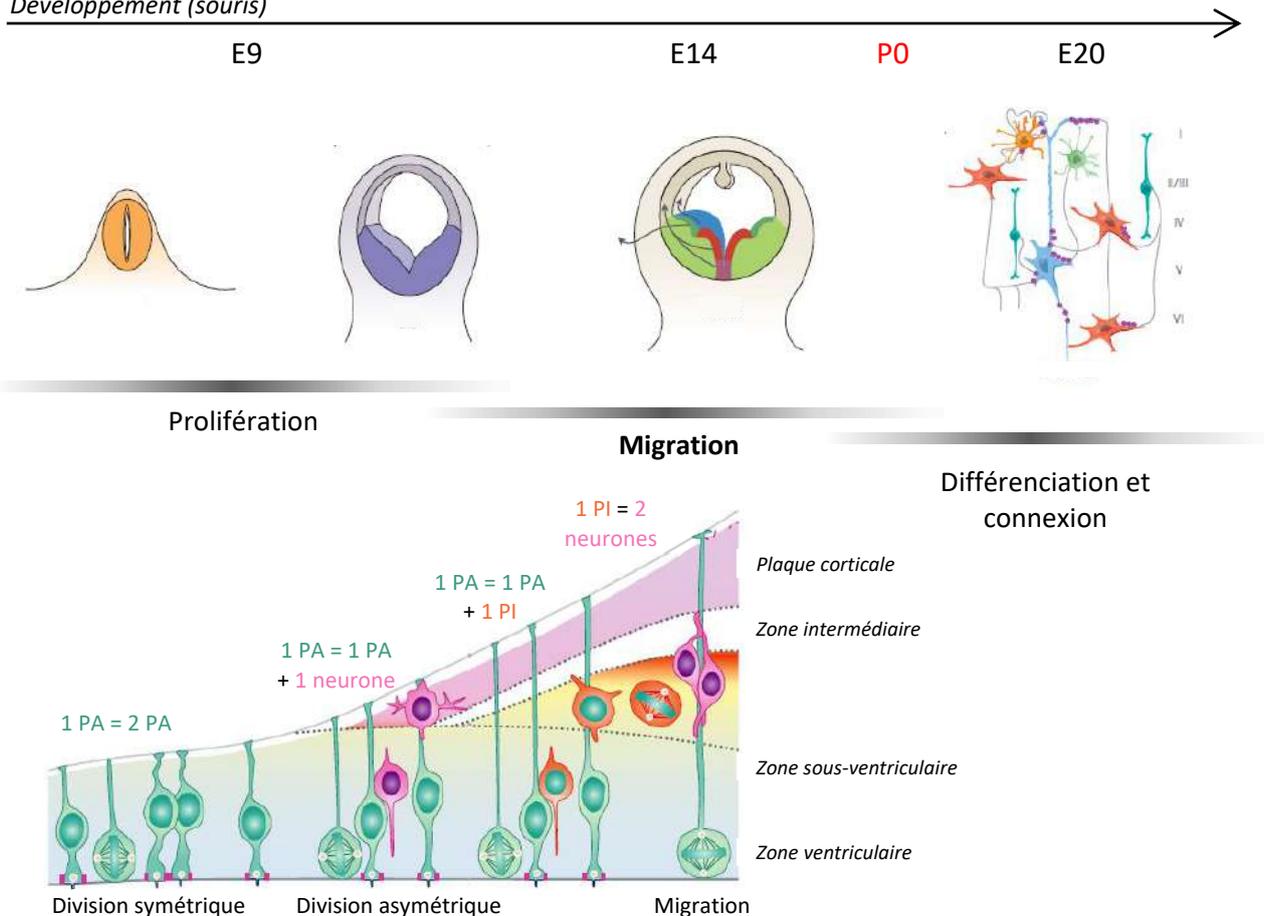
Lorsque le tube neural se ferme, le futur encéphale n'est constitué que d'une seule couche de cellules autour de la lumière du tube (i.e l'espace intérieur du tube) : la zone ventriculaire (ZV). Cette zone est un épithélium pseudostratifié formé de progéniteurs neuraux multipotents qui vont générer les différentes classes de neurones et de cellules gliales (à l'exception de la microglie). Ces progéniteurs neuraux, ou progéniteurs apicaux, s'étendent par un long prolongement sur toute l'épaisseur du tube neural. Le noyau de ces cellules effectue une migration le long de l'axe apico-basal, appelée migration intercinétique, en fonction des phases du cycle cellulaire : les cellules en mitoses sont situées au bord

de la lumière du tube et les cellules en phases S sont situées dans la moitié basale du neuroépithélium. La division des progéniteurs apicaux peut donner lieu à la génération de deux autres progéniteurs qui restent dans le cycle cellulaire (division symétrique), ou d'un progéniteur et d'une cellule post-mitotique qui perd son attachement apical et migre vers le côté basal (division asymétrique). Au début du développement embryonnaire, le nombre de cellules souches neurales est bien trop faible pour générer l'ensemble de neurones présents chez l'adulte. Aux stades précoces de développement, on observe ainsi majoritairement des cellules en prolifération qui augmentent la taille de la population de cellules neurales et portent la croissance de la structure. Les progéniteurs apicaux se divisent alors majoritairement sur un mode symétrique, pour générer deux autres progéniteurs (Figure 20). Ensuite, le mode de division bascule progressivement vers un mode asymétrique pour générer un progéniteur et un neurone post-mitotique. Dans certaines régions du cerveau, et notamment le néocortex, les progéniteurs apicaux peuvent également générer par division asymétrique un progéniteur intermédiaire qui perd son attachement basal et qui donnera ensuite deux neurones par division symétrique (Paridaen and Huttner, 2014) (Figure 20).

Une fois générés, les jeunes neurones entament une phase de migration pour rejoindre leur zone d'intégration dans les circuits neuronaux (Figure 20). Au début du développement, les distances parcourues par les jeunes neurones sont faibles. Au cours du développement de l'encéphale, le tube neural subit d'importantes transformations morphologiques, et la lumière du tube s'organise en un réseau de cavités qui forment les futurs ventricules cérébraux. Le volume du cerveau augmente et les distances à parcourir pour les jeunes neurones en migration depuis les zones prolifératives bordant les ventricules (zones ventriculaires) augmentent également. Après les phases de prolifération, on observe donc (à partir du deuxième tiers de la gestation chez la souris) une phase de déplacement massif de jeunes neurones vers leur zone d'intégration. Cette phase est cruciale pour le développement morphologique et fonctionnel du cerveau adulte, et concerne l'immense majorité des neurones. On considère que la majorité des neurones sont arrivés à destination à la naissance, même si une migration résiduelle est observée dans les premières semaines post-natales.

Une fois arrivés dans leur zone cible, les jeunes neurones prennent leur place dans les réseaux neuronaux et se connectent (Figure 20). Ils développent ainsi un arbre dendritique et un axone qui s'étend pour se connecter aux neurones cibles dans d'autres zones cérébrales. Au début du développement post-natal, on observe le développement massif de connexions dites exubérantes, suivi d'une élimination de près de 50% de ces connexions (Stiles and Jernigan, 2010).

Développement (souris)



**Figure 20 | Place de la migration neuronale dans le développement du cerveau**

Aux stades précoces du développement, on observe une prolifération importante des progéniteurs neuronaux (progéniteurs apicaux PA) par division symétrique. Ensuite, des divisions asymétriques génèrent un neurone ou un progéniteur intermédiaire (PI), qui génère ensuite 2 neurones. Les jeunes neurones post-mitotiques entament ensuite une phase de migration pour rejoindre leur zone cible. A la naissance, une majorité des neurones est placée, se différencie et se connecte aux autres neurones. Adapté de (Kepecs and Fishell, 2014; Paridaen and Huttner, 2014).

### 3.1.3 Le cortex cérébral

Le cortex cérébral est la couche superficielle qui enveloppe le cerveau et la structure la plus étendue de l'encéphale des mammifères. Il tient un rôle fondamental dans le traitement des données sensorielles et motrices, ainsi que dans les fonctions intellectuelles dites supérieures (langage, mémoire, planification, etc.). On distingue chez les mammifères trois types de cortex : l'archicortex, le paléocortex et le néocortex, apparus successivement au cours de l'évolution et qui diffèrent par leur organisation cytoarchitecturale. Le cortex cérébral est segmenté dans le plan tangent en aires spécialisées dévolues à une fonction précise. La complexité des capacités cognitives et celle des comportements sont

corrélées à la taille du cortex cérébral et à la présence de gyrus (ou circonvolutions) qui augmentent la surface corticale (Krubitzer et al., 2005).

Le cortex cérébral présente une organisation cytoarchitecturale en couches parallèles : il est dit laminé (Figure 21A). Chez les mammifères, le néocortex est constitué de six couches cellulaires et correspond à environ 90% du manteau cortical. L'expansion des capacités intellectuelles chez les espèces dites « avancées » peut être corrélée à l'augmentation de la taille et de la complexité du cortex au cours de l'évolution (Krubitzer et al., 2005). Le cortex cérébral est formé de deux types de neurones : les neurones excitateurs ou neurones principaux qui représentent 70 à 80% de la population, et les neurones inhibiteurs ou interneurons qui représentent les 20 à 30% des neurones restants. Ce ratio est relativement constant entre les régions et les espèces, et semble ainsi garantir une balance optimale entre excitation et inhibition tout en maximisant leurs capacités « computationnelles » (Hendry et al., 1987; Sahara et al., 2012).

Les neurones principaux transmettent des signaux excitateurs grâce à un neurotransmetteur, le glutamate, et sont donc dits glutamatergiques. Un grand nombre d'entre eux, les neurones pyramidaux (car leur corps cellulaire est en forme de triangle ou de pyramide), projettent leur axone à une distance très éloignée de leur soma, propageant ainsi les messages corticaux vers des structures subcorticales.

Les interneurons sont en grande majorité inhibiteurs. Ils utilisent le GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) comme neurotransmetteur et sont donc dits GABAergiques. Ils ont pour particularité d'avoir des dendrites sans épines et de pouvoir recevoir des informations de synapses excitatrices et inhibitrices au niveau de leur soma. De plus, contrairement aux neurones pyramidaux de projection, leur axone est restreint au cortex : ils interviennent donc dans le contrôle local de l'activité des autres neurones du cortex et constituent ainsi un élément crucial dans la balance fonctionnelle des circuits neuronaux. Alors que les neurones pyramidaux, qui constituent la majorité des neurones principaux, ont des caractéristiques morphologiques, physiologiques et moléculaires relativement stéréotypées, les interneurons présentent une large diversité de sous-types caractérisés par des morphologies, des propriétés physiologiques et biochimiques très variées. Cette importante variété permet la fine régulation de l'inhibition nécessaire à l'exécution complexe des processus corticaux supérieurs (Kepecs and Fishell, 2014).

La « classification PING » ou « terminologie Petilla », établie en 2008 par un comité international d'experts a abouti à l'identification d'au moins 15 sous-types d'interneurons (Petilla Interneuron Nomenclature Group et al., 2008).

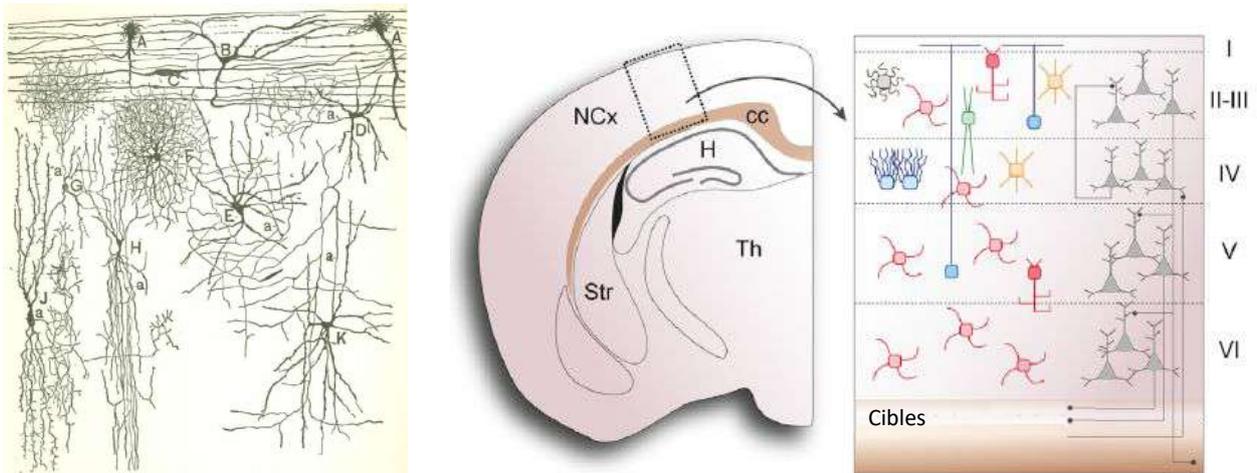
Cette terminologie se base sur les critères suivants (Figure 21B) :

- La morphologie : qui comprend la taille du corps cellulaire ainsi que les prolongements, axonal et dendritiques (segment initial de l'axone, arborisation, branchements, etc.) ;
- La cible synaptique : qui prend en compte le type de cellule et le compartiment subcellulaire sélectivement ciblés ;
- Les marqueurs moléculaires : critère le plus utilisé, il est basé sur l'expression de molécules variées. On peut citer des neuropeptides tels que le peptide intestinal vasoactif (VIP), la somatostatine (SST), le neuropeptide Y (NPY), des protéines liant le calcium comme la parvalbumine (PV), la calrétinine (CR) et la calbindine (CB), la glycoprotéine Reelin ou le récepteur à la sérotonine 5HT3aR ;
- Les propriétés électrophysiologiques intrinsèques (taux de décharge, etc.).

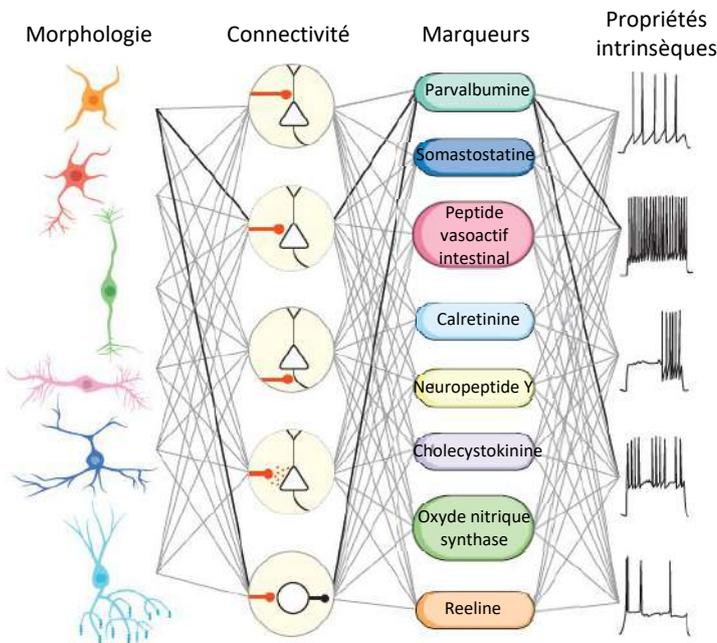
Les interneurons du néocortex peuvent être globalement séparés en cinq grands groupes : le groupe le plus abondant contient des interneurons à taux de décharge rapide (cellules à panier, exprimant la PV et cellules chandelier). Un second groupe présente un taux de décharge plus lent et exprime la SST (cellule Martinotti ou non Martinotti). Le troisième groupe exprime le VIP, potentiellement la CR, et montre une morphologie bipolaire ou en « double bouquet ». Les cellules neurogliaformes exprimant la Reelin et le récepteur 5HT3a et les cellules contenant le NPY constituent le quatrième et cinquième groupe d'interneurones corticaux (Bartolini et al., 2013) (Figure 21C).

La formation des circuits corticaux repose sur la migration coordonnée des neurones excitateurs et inhibiteurs pendant le développement embryonnaire, que nous allons maintenant aborder.

**A Les interneurons GABAergiques du cortex**



**B Différents critères de classification**



**C Principaux groupes d'interneurons**

<b>Cellules chandelier</b>	PV+ ou PV- Décharge rapide
<b>Cellules à panier</b>	PV+ Décharge rapide
<b>Cellules Martinotti</b>	SST+, souvent CR+ Décharge lente
<b>Cellules non Martinotti</b>	
<b>Cellules en double bouquet</b>	VIP+ Décharge irrégulière
<b>Cellules neurogliaformes</b>	Reeline +, 5HT3a+
<b>Cellules multipolaires</b>	NPY+ Décharge irrégulière

**Figure 21 | Une grande diversité d'interneurons corticaux**

(A) Gauche : dessin illustrant la diversité morphologique des interneurons du cortex moteur d'un enfant d'un mois par Ramon y Cajal, qui les nomme alors « cells with short axons ». *Comparative study of the sensory areas of the human cortex*, 1899. Droite : Schéma d'une coupe coronale de cerveau de souris et d'une coupe de cortex figurant les différents types d'interneurons corticaux et leur localisation dans les différentes couches corticales. (B) Différents critères sont utilisés pour classer les différents types d'interneurons : la morphologie, la connectivité (compartiment cellulaire visé), les marqueurs moléculaires, et les propriétés électrophysiologiques intrinsèques. (C) Ces différents critères ont permis d'établir 5 grands groupes d'interneurons. PV : parvalbumine, SST : somatostatine, VIP : peptide vaso-intestinal, NPY : neuropeptide Y. Adapté de (Bartolini et al., 2013; Kepecs and Fishell, 2014).

## 3.2 La migration radiale des neurones excitateurs du cortex

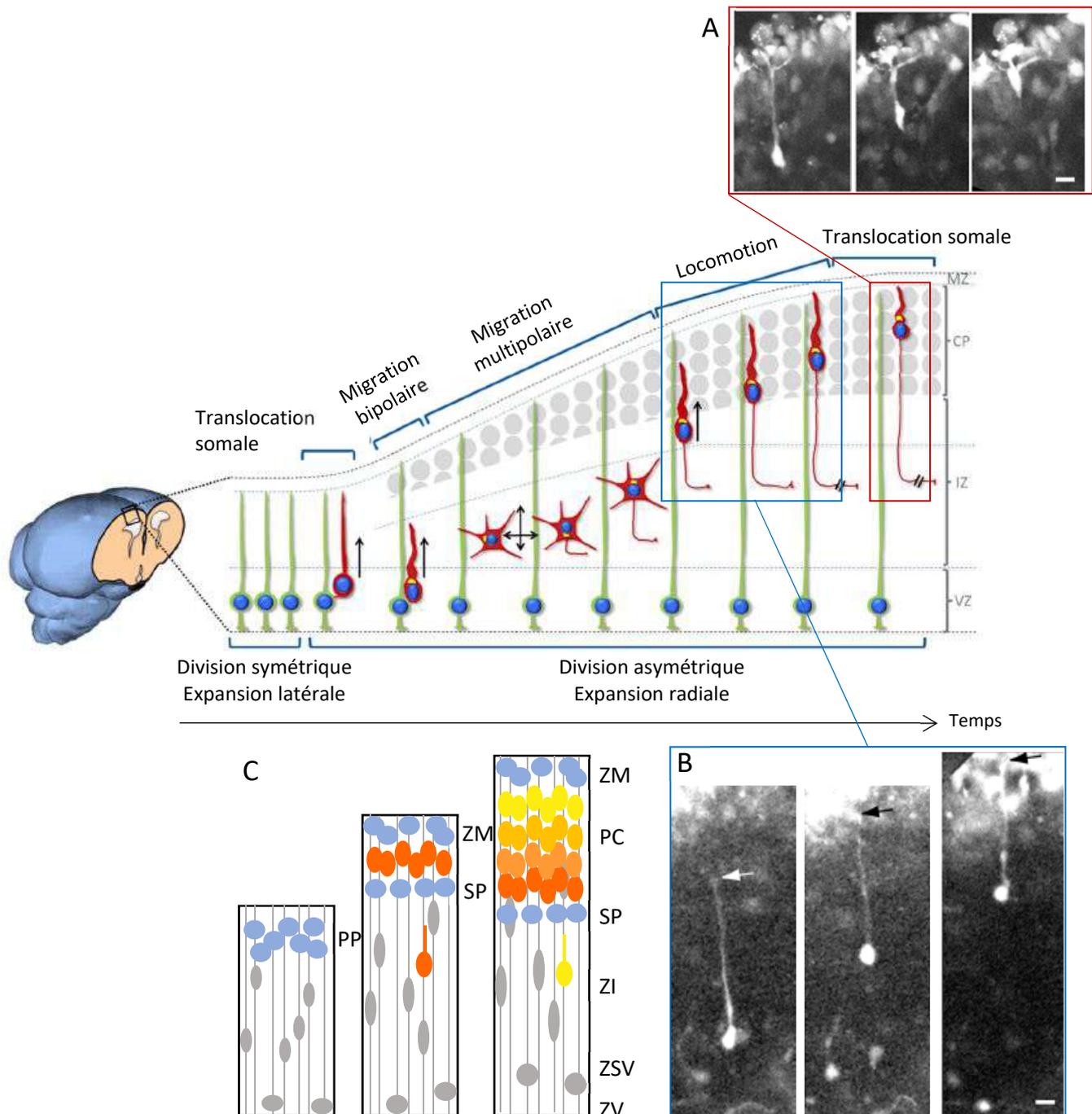
Les premières études sur le développement des différentes régions du cerveau et de la moelle épinière a conduit à l'hypothèse que le mouvement radial des jeunes neurones est un mouvement général pendant la formation du système nerveux central des vertébrés. Les progéniteurs apicaux, ou cellules de glie radiaire, étendent sur toute l'épaisseur du tube neural un processus qui sert de guide physique à la migration des jeunes neurones. Ce processus a été suggéré à la suite d'études observant l'alignement des neurones post-mitotiques avec les fibres de glie radiaire pendant le développement du cortex et du cervelet, puis corroboré par de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* (Marín and Rubenstein, 2003).

Dans le cortex cérébral, les neurones excitateurs sont générés localement dans les zones de prolifération primaires (zone ventriculaire ZV qui contient les progéniteurs apicaux) et secondaires (zone sous ventriculaire ZSV qui contient les progéniteurs intermédiaires) et migrent radialement le long des processus de glie radiaire. La première cohorte de neurones excitateurs qui migre hors de la zone ventriculaire à E11 chez la souris, constitue une couche transitoire appelée pré-plaque (Figure 22C). La seconde vague de neurone (vers E13) forme une structure dense, la plaque corticale (PC) qui sépare la pré-plaque en deux couches, la zone marginale (ZM, superficielle) et la sous-plaque (SP, profonde) (Figure 22C). Le développement du cortex se poursuit par l'arrivée de vagues successives de neurones qui forment progressivement les six couches du cortex adulte. Ces couches se forment selon un patron de migration inversé, ou les neurones en migration dépassent leurs aînés pour s'installer dans les couches plus superficielles (Narboux-Nême and Gaspar, 2008; Vitalis and Rossier, 2011) (Figure 22C).

Lors de leur migration vers les zones superficielles du cortex, les jeunes neurones excitateurs passent par différentes phases de mouvement (Figure 22). Après leur naissance, à partir de la division d'un progéniteur apical, les jeunes neurones adoptent une morphologie bipolaire et se déplacent radialement de la zone ventriculaire (ZV) jusqu'à la zone sous-ventriculaire (ZSV)/zone intermédiaire (ZI). Dans cette zone, les neurones peuvent séjourner jusqu'à 24h et adoptent une morphologie multipolaire. Pendant cette étape, les neurones sont très dynamiques, étendant et rétractant continuellement des processus. Ils se déplacent au sein de la ZSV de manière a priori aléatoire, vers la surface ventriculaire, la surface piaie ou dans le plan tangent (Cooper et al., 2014). Au terme de cette phase, un processus commence à s'étendre pour devenir l'axone. Ce processus principal est stabilisé et réorienté vers la surface piaie. Les jeunes neurones migrent alors selon un mode de migration dit par

locomotion, avec leur prolongement de migration accolé aux fibres de glie radiaire (Figure 22B). Leur morphologie est alors bipolaire, avec un processus à l'arrière de la cellule qui est en fait le futur axone. Cette phase de locomotion s'arrête quand le corps cellulaire atteint la plaque corticale. L'extrémité du prolongement de migration s'attache alors à la surface piaie et le noyau monte alors vers cette extrémité avec une vitesse d'environ 60 $\mu$ m/h, proche de celle des pics observés pendant la phase de locomotion. Cette étape appelée translocation somale, est indépendante de la glie radiaire et est également le mode de migration principal observé au début de la formation du cortex (Figure 22A). En effet, à ces stades précoces, l'épaisseur du cortex est encore faible et les jeunes neurones héritent de leur progéniteur apical un long processus déjà ancré à la surface piaie. Ils détachent ensuite simplement leur processus apical pour migrer par translocation vers la surface (Cooper, 2013; Kon et al., 2017; Kriegstein and Noctor, 2004; Nadarajah et al., 2001).

Ces différentes phases de migration sont influencées par une combinaison de signaux extrinsèques (molécules d'adhésion, signaux motogéniques, etc.) et intrinsèques (régulateurs du cytosquelette). Les mécanismes de transition entre ces différentes phases de mouvement impliquent également un ensemble de facteurs qui restent encore mal connus.



### Figure 22 | Migration radiale des neurones excitateurs et formation des couches corticales

Après leur génération par un progéniteur apical ou cellule de glie radiaire, les jeunes neurones excitateurs migrent radialement le long des processus de glie radiaire en plusieurs étapes : migration bipolaire, migration multipolaire, locomotion et translocation somale (Kon et al., 2017) (A) Séquence montrant une translocation somale (1h) (B) Mouvement de locomotion (1h30). Enregistrement dans une couche de cortex à E14. Echelle 10 $\mu$ m (Nadarajah et al., 2001) (C) Les neurones excitateurs générés dans la zone ventriculaire (ZV) et sous-ventriculaire (ZSV) migrent selon un schéma « inside-out » et forment les couches corticales embryonnaires : la préplaque (PP), scindée en zone marginale (ZM) et sous-plaque (SP) entre lesquelles la plaque corticale (PC) s'épaissit. Le développement de ces couches conduit à un néocortex à 6 couches chez les mammifères.

### 3.3 La migration tangentielle des interneurones corticaux

#### 3.3.1 Génération et spécification des interneurones dans les éminences ganglionnaires

A l'inverse des neurones excitateurs générés localement dans les zones ventriculaires du cortex, les interneurones sont générés dans d'autres régions situées ventralement, les éminences ganglionnaires (EG), et migrent tangentiellement pour rejoindre le cortex. Cette conclusion a émergé à partir de différentes observations. Pour commencer, des expériences de marquages rétroviraux ont mis en évidence des clones composés uniquement de neurones pyramidaux ou GABAergiques (Mione et al., 1994; Parnavelas et al., 1991), qui ont tendance à être plus dispersés que les clones de neurones pyramidaux (Mione et al., 1994, 1997). D'autres études ont également noté la présence de cellules orientées non radialement dans le cortex (Van Eden et al., 1989; Tan and Breen, 1993). Les expériences suivantes, en plaçant des cristaux de Dil dans le télencéphale ventral, ont démontré la migration de ces cellules dans le néocortex, processus bloqué par une incision à la frontière entre pallium (télencéphale dorsal) et subpallium (télencéphale ventral) (De Carlos et al., 1996; Lavdas et al., 1999; Tamamaki et al., 1997). La preuve finale de l'origine extracorticale des interneurones provient d'expériences génétiques avec le double mutant *Dlx1* et *Dlx2* (facteur de transcription exprimé dans les EG), qui montre une réduction de près de 70% du nombre d'interneurones dans le cortex (Anderson et al., 1997).

Chez la souris, les EG apparaissent vers E11 et peuvent être séparés en trois structures anatomiquement distinctes : l'EG latérale (EGL), l'EG médiale (EGM) et l'EG caudale (EGC) en fonction de leur positionnement rostro-caudal et médio-latéral (Figure 23A). Des expériences de marquage par Dil dans les différentes EG ou de transplantation *in vivo* ont permis de déterminer que la grande majorité des interneurones est produite au sein de l'EGM (50-60% des interneurones, pic de production entre E12 et E13) (Lavdas et al., 1999; Wichterle et al., 1999) et de l'EGC (30-40% des interneurones, pic de production entre E15 et E16) (Nery et al., 2002; Xu et al., 2004). Plus tard, l'aire préoptique (APO) a également été identifiée comme une zone de génération de 8 à 10% des interneurones (Gelman et al., 2011, 2009). D'autres régions sont encore discutées comme étant à l'origine ou non d'interneurones corticaux. L'EGL a été initialement décrite comme la région productrice des interneurones corticaux (Anderson et al., 1997; Tamamaki et al., 1997). De nombreuses autres études ont ensuite montré que les neurones générés dans l'EGL ne parviennent pas à migrer dans le cortex dorsal (De Carlos et al., 1996; Nery et al., 2002; Wichterle et al., 2001). Finalement, l'EGL ne semble être qu'une zone de transit

des interneurones en provenance de l'EGM et de l'EGC, mais son implication dans la génération d'interneurones, en particulier à des stades tardifs, n'est pas totalement exclue. L'aire entopédonculaire, une région ventrale du subpallium, a également été proposée comme source d'interneurones, mais la proximité de cette zone avec l'APO et l'EGM rend certaines interprétations expérimentales ambiguës (Lavdas et al., 1999).

Les différentes EG produisent différents sous-types d'interneurones. L'EGM donne naissance à une majorité d'interneurones exprimant la PV (65% environ), les 35% restant exprimant la SST (certains d'entre eux exprimant en plus la CR, le NPY ou la Reeline). L'EGC produit principalement des interneurones exprimant le récepteur 5HT3a, avec des sous-populations exprimant la CR, la Reeline et le VIP, mais pas la SST (Butt et al., 2005; Miyoshi et al., 2010; Xu et al., 2004). L'APO quant à elle produit un premier groupe d'interneurones de types divers, et un second majoritairement composé de neurones à Reeline et/ou NPY (Gelman et al., 2011, 2009) (Figure 23A).

La spécification de ces différentes régions et de la diversité des interneurones qu'elles génèrent est sous le contrôle d'une combinatoire complexe et spécifique de facteurs de transcription. Les facteurs de transcription *Dlx1/2* et *Mash1*, exprimés dans l'ensemble des régions productrices, spécifient l'identité d'interneurone (Long et al., 2009). *Nkx2.1* joue un rôle majeur dans la spécification de l'EGM et de l'APO (Butt et al., 2005; Xu et al., 2004). *Nkx5.1*, *Nkx6.2* et *Dbx1* sont exprimés dans des sous régions de l'APO et spécifient au moins deux sous-populations issues de cette région (Gelman et al., 2011, 2009). *CRBP1*, *COUPTF1/2* ou encore *Nkx6.2* sont quant à eux largement exprimés dans l'EGC (Kanatani et al., 2008; Nery et al., 2002; Sousa et al., 2009) (Figure 23A). Aucun de ces facteurs de transcription n'est exprimé sélectivement dans une des régions productrices. Il semblerait donc que ce soit l'association unique de plusieurs facteurs de transcription qui confère à chaque région son identité moléculaire. Il est également important de noter que certains morphogènes comme Sonic Hedgehog (*Shh*) participent à l'établissement et au contrôle des territoires d'expression de ces différents facteurs de transcription (Fuccillo et al., 2006).

Cette combinaison de facteurs de transcription et de morphogènes est néanmoins insuffisante pour expliquer toute la diversité des interneurones observés dans le cortex. Deux théories proposent une explication quant à une partie de la diversité des interneurones produits dans l'EGM.

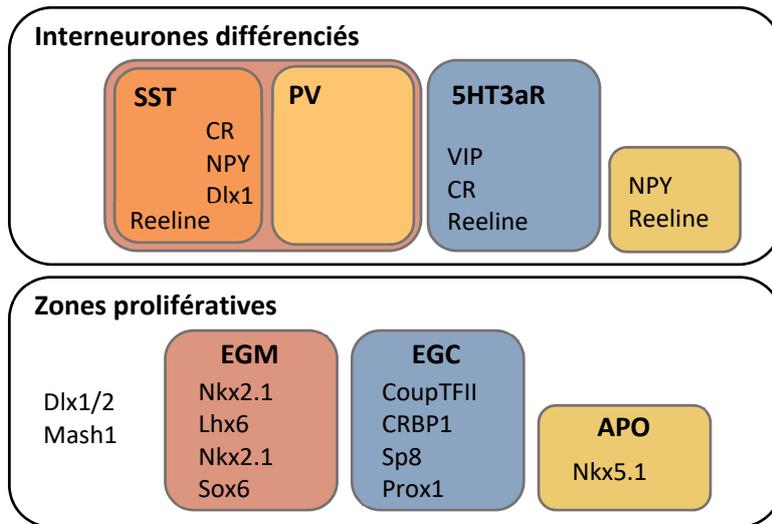
Pour commencer, un biais temporel existe dans l'EGM, qui génère préférentiellement des interneurones SST aux stades précoces de développement et des interneurones PV à des stades plus tardifs (Figure 23B). Ce biais a notamment été mis en évidence par des expériences d'injection de BrdU (bromodésoxyuridine). Des cellules d'EGM en phase S ont été marquées entre E13,5 et E15,5 et ont ensuite été transplantées dans un néocortex non marqué afin d'en étudier le devenir jusqu'à P30. Alors

qu'une proportion équivalente d'interneurones SST et PV a été observée après une injection à E13,5, des interneurones PV sont principalement observés après une injection à E15,5 (Butt et al., 2005; Inan et al., 2012).

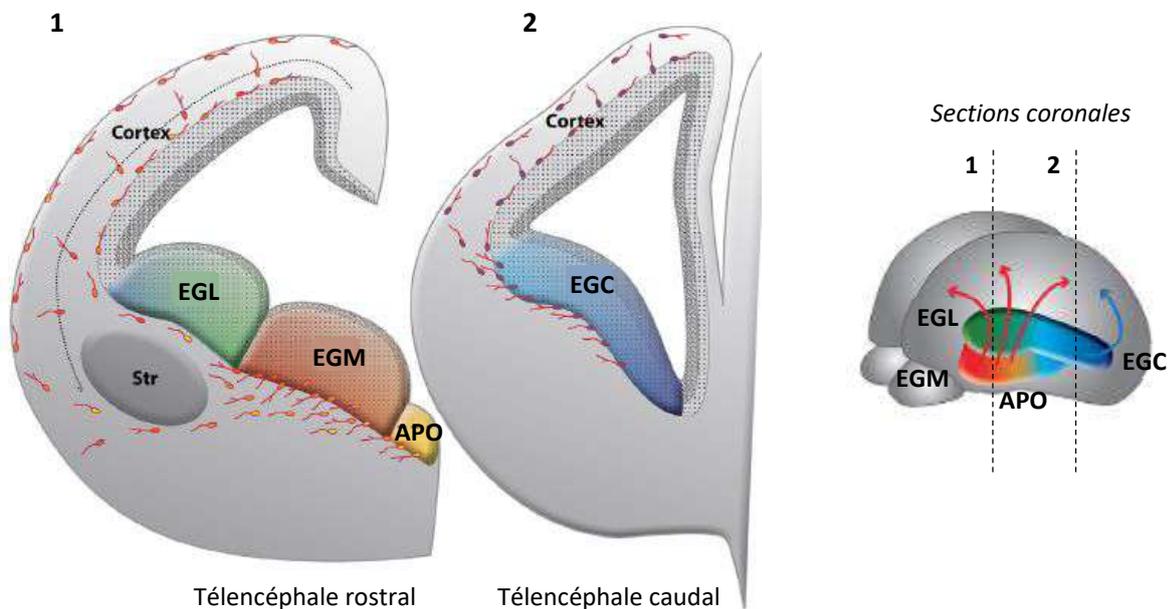
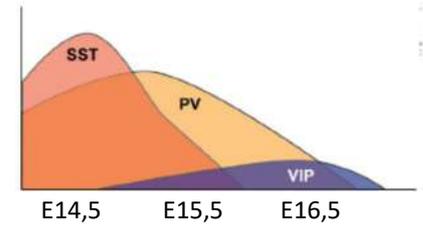
Les mêmes études ayant montré l'existence d'un biais temporel dans la génération des différents lignages d'interneurones de l'EGM ont également mis en évidence l'existence d'un biais spatial. Des expériences de transplantation des parties ventrales ou dorsales de l'EGM ont montré l'existence d'un gradient dorso-ventral : les cellules marquées provenant de l'EGM dorsale deviennent préférentiellement des interneurones à SST (rapport SST/PV d'environ 1,5 à partir d'E13,5) et celles provenant de la MGE ventrale préférentiellement des interneurones PV (rapport PV/SST entre 3 et 5 à partir d'E13,5) (Butt et al., 2005; Inan et al., 2012; Wonders et al., 2008).

Finalement, il est important de noter que l'identité finale des interneurones est contrôlée par un mélange de spécification génétique à leur naissance, mais également par l'exposition à différents signaux le long de leur migration vers le cortex, ainsi que la maturation synaptique finale et la connectivité qui définit fondamentalement la fonction de ces neurones.

## A Marqueurs moléculaires des interneurons et de leurs progéniteurs



## B Biais temporel de génération dans l'EGL



## Figure 23 | Génération et spécification des interneurons corticaux dans les éminences ganglionnaires

(A) Les différentes éminences ganglionnaires (éminence ganglionnaire latérale EGL, éminence ganglionnaire médiane EGM, éminence ganglionnaire caudale EGC, aire préoptique APO) expriment une combinaison de différents facteurs de transcription, et génèrent des sous-types distincts d'interneurons (B) Il existe par ailleurs un biais temporel dans la génération de différents types d'interneurons dans l'EGL : les interneurons SST sont générés aux stades précoces, et les interneurons PV aux stades plus tardifs. Adapté de (Laclef and Métin, 2018).

### 3.3.2 Migration des interneurones jusqu'au cortex

Les jeunes interneurones générés à partir des progéniteurs des zones ventriculaires migrent hors des éminences ganglionnaires le long des fibres de glie radiaire et s'organisent en flux tangentiels (Brown et al., 2011). Les interneurones corticaux migrent depuis les EG jusqu'au pallium en suivant deux voies de migration majeures, une superficielle et une profonde (Figure 24). Arrivés aux cortex, ils colonisent ensuite la plaque corticale en effectuant un changement de direction de tangential à radial. Les interneurones parcourent donc, comparativement aux neurones excitateurs à migration radiaire, de grandes distances dans le cerveau en développement. Ils se déplacent également en moyenne plus vite (entre 50 et 80 $\mu\text{m}/\text{h}$ ) que les neurones excitateurs (environ 20 $\mu\text{m}/\text{h}$ ) (Polleux et al., 2002; Valiente and Martini, 2009).

Les interneurones issus de différentes régions prolifératives empruntent différentes voies pour rejoindre le cortex. Par des expériences d'électroporation focale, Yozu et al. ont montré que les interneurones issus de l'EGM envahissent le cortex de façon assez homogène selon l'axe rostro-caudal, tandis que ceux de l'EGC sont retrouvés principalement dans la partie caudale du télencéphale où ils forment le « Caudal Migratory Stream » (Yozu et al., 2005). Les interneurones en provenance de l'APO sont quant à eux situés plutôt rostralement (Gelman and Marín, 2010). On se concentrera pour la suite sur les interneurones issus de l'EGM chez la souris, pour lesquels la littérature est la plus importante et sur lesquels se sont portés mes travaux de thèse.

Après avoir quitté l'EGM, les interneurones en route vers le cortex se distribuent selon plusieurs voies de migration. Dans le subpallium, ils contournent le striatum en développement, région non permissive, et se répartissent en deux flux majeurs : le flux superficiel, à la surface du cerveau et le flux profond, situé dans la zone sous-ventriculaire (ZSV) du subpallium (Marín and Rubenstein, 2001; Métin et al., 2006) (Figure 24). Ces flux se poursuivent dans le pallium, où le flux superficiel est aussi appelé flux marginal, car les interneurones se placent dans la zone marginale (Ang et al., 2003). Le flux profond se situe à la base de la zone intermédiaire et dans la ZSV, et concentre trois-quarts des interneurones en migration (Anderson et al., 2001; Faux et al., 2012; Lavdas et al., 1999). Une troisième voie de migration, mineure, se situe dans la sous-plaque (Marín and Rubenstein, 2001) (Figure 24). Les interneurones empruntent préférentiellement l'une ou l'autre de ces voies selon leur région d'origine et leur date de naissance. Aux stades précoces (E12-E13), les cellules de l'EGM contournent le striatum par le flux superficiel et entrent dans le cortex par la voie marginale et la sous-plaque (Anderson et al., 2001; Lavdas et al., 1999; Marín and Rubenstein, 2001). Les interneurones issus de l'EGC quant à eux semblent atteindre le pallium uniquement par le flux profond (Rubin et al., 2010).

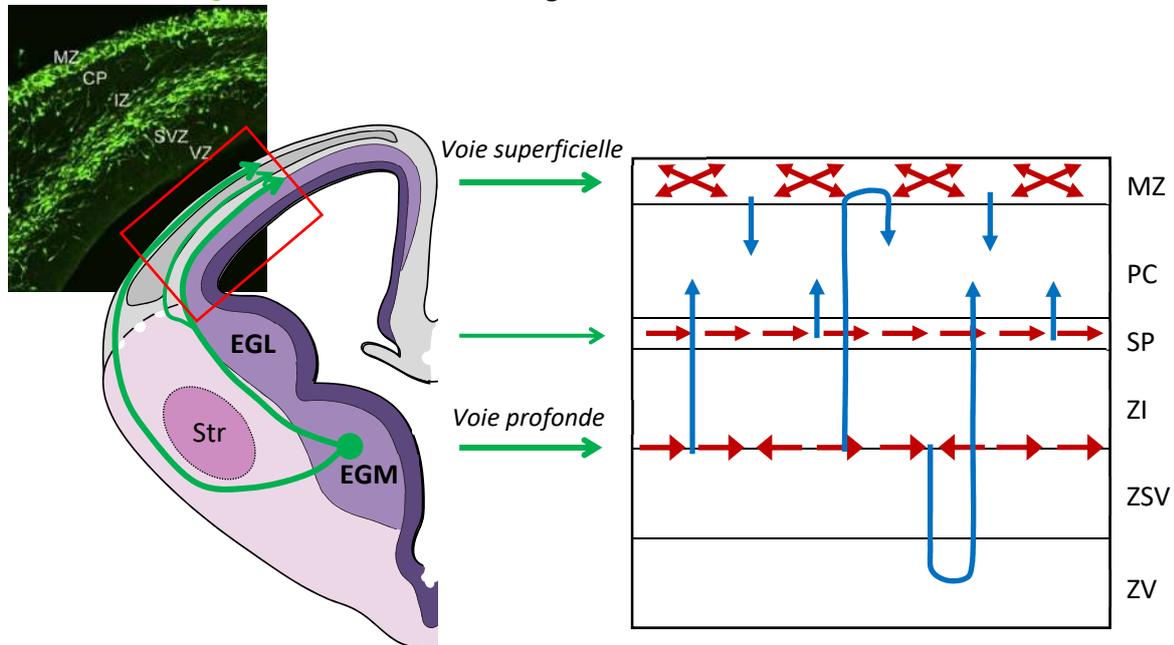
Au sein du cortex, les interneurons du flux profond à E13,5 migrent essentiellement dans le plan coronal, selon une direction ventro-dorsale et montrent une orientation majoritairement tangente. A E15,5, on observe toujours une forte migration tangentielle dans la ZI/ZSV à laquelle s'ajoute une petite proportion de cellules stationnaires et d'autres qui montrent une orientation oblique (Tanaka et al., 2003). On peut néanmoins noter qu'une proportion non négligeable de cellules (18% dans la ZI) se déplace dans le sens inverse, soit du pallium vers le subpallium (Tanaka et al., 2003; Yokota et al., 2007). A l'inverse, les cellules du flux superficiel dans la zone marginale montrent des orientations très diverses (Ang et al., 2003; Tanaka et al., 2006) (Figure 24). Des expériences d'imagerie en temps réel dans la zone marginale dans le plan tangent sur des explants de cortex aplatis montrent ainsi que les cellules dans cette zone se déplacent dans toutes les directions et sur de longues distances (jusqu'à 2mm) (Tanaka et al., 2006). La migration multidirectionnelle dans la ZM peut être modélisée par une marche aléatoire et contribuerait à la dispersion des cellules sur l'ensemble de la surface corticale et au mélange de sous-types d'interneurones corticaux (Tanaka et al., 2009). A E13,5, on observe une motilité différente des interneurons dans les deux flux de migration, avec des cellules plus rapides dans la voie profonde (24 $\mu$ m/h) que dans la voie superficielle (19 $\mu$ m/h), où les interneurons peuvent même rester stationnaires (Tanaka et al., 2003, 2006).

A partir de E14,5, les interneurons commencent à changer d'orientation et de comportement dynamique pour migrer radialement et entrer dans la plaque corticale (vers la surface piaale pour les neurones du flux profond et vers la zone ventriculaire pour les cellules du flux superficiel) (Tanaka et al., 2003, 2006) (Figure 24). A E18,5, 40% des interneurons sont retrouvés dans la PC (López-Bendito et al., 2008). Les trajets des interneurons dans l'épaisseur du cortex sont variés. Une majorité de cellules quittent les flux tangentiels pour migrer radialement vers la PC (Ang et al., 2003; Polleux et al., 2002; Tanaka et al., 2003) (Figure 24). Des études par électroporation in utero de l'EGM à E12,5 montrent que certaines cellules migrent radialement de la ZSV jusqu'à la ZM avant de redescendre se positionner dans la PC à E18,5 (Tanaka et al., 2009) (Figure 24). Un certain nombre de cellules a également été observé migrant radialement vers la ZV (potentiellement pour y recevoir des signaux de positionnement) avant de changer de polarité et de monter radialement vers les couches superficielles (Nadarajah et al., 2002) (Figure 24). Ainsi, de nombreux échanges ont lieu entre les différents flux par des mouvements radiaux et obliques. La fonction de ces mouvements complexes est encore mal comprise mais pourrait participer au bon positionnement final des interneurons dans les couches du cortex.

Un ralentissement progressif de la motilité des interneurons s'effectue au cours du temps, particulièrement à partir du stade E18,5, pour s'arrêter presque complètement à la fin de la première semaine post-natale (Inamura et al., 2012). A ce stade, les interneurons ont définitivement quitté les couches autres que la PC pour occuper leur position finale dans les six couches corticales. Quelques

déplacements de cellules de la ZM à la PC sont néanmoins encore observés à des stades post-nataux, indiquant que certains interneurons adoptent leur position finale à des stades tardifs de développement (Bortone and Polleux, 2009; Hevner et al., 2004).

### Interneurones en migration



**Figure 24 | Voies de migration et mouvement des interneurons corticaux**

Gauche : coupe coronale de cerveau figurant les principales voies de migration tangentielle des interneurons corticaux depuis l'EGM. Agrandissement d'une coupe de cortex à E14,5 où les interneurons en migration en vert s'accumulent en deux flux tangentiels superficiels et profonds (Higginbotham et al., 2012). Droite : mouvement des interneurons dans les flux tangentiels aux stades précoces (flèches rouges) puis réorientation radiale et invasion de la plaque corticale aux stades plus tardifs (flèches bleues)

### 3.3.3 Positionnement final et mise en place des circuits corticaux

Le destin des interneurons dans les différentes couches corticales dépend de leur sous-type et de leur programme génétique. Celui-ci détermine les capacités migratrices intrinsèques des cellules ainsi que leur capacité à répondre à des signaux extrinsèques favorisant son arrêt au « bon » endroit.

Une éventuelle prédétermination de l'aire néocorticale de destination des interneurons en fonction de leur origine clonale est une question qui a motivé un certain nombre d'études, dont les conclusions sont parfois contradictoires. Toutes mettent en évidence que les interneurons clonaux ne se distribuent pas de manière aléatoire dans le télencéphale (70% d'entre eux vont dans une même structure télencéphalique). En revanche, la question du regroupement d'interneurons clonaux en

groupes dans le cortex reste sujette à débat. Ainsi, autour de 10% des interneurons clonaux se regrouperaient au sein d'une même colonne néocorticale, tandis que 60% d'entre eux pourraient se retrouver au sein d'une même aire néocorticale (région plus étendue) (Brown et al., 2011; Ciceri et al., 2013; Harwell et al., 2015; Mayer et al., 2015; Sultan et al., 2016).

On a évoqué précédemment l'existence d'un biais temporel quant à la génération de différents sous-types d'interneurones dans l'EGM. Ce biais temporel concerne également le positionnement final des interneurones. En effet, des expériences de greffes isochroniques de cellules d'EGM marquées ont permis de révéler que les interneurones générés à des stades précoces (E12,5) s'intègrent préférentiellement dans les couches corticales profondes, et les interneurones nés plus tardivement (E15,5) dans les couches superficielles (Valcanis and Tan, 2003). Comme pour les neurones excitateurs, les interneurones corticaux issus de l'EGM semblent ainsi adopter un patron de positionnement « inside-out », et se retrouvent dans les mêmes zones que les neurones excitateurs générés au même moment.

La présence dans les mêmes couches des interneurones de l'EGM et des neurones pyramidaux de même âge pourrait être expliquée notamment par la production de signaux par les neurones pyramidaux qui guideraient les interneurones vers eux. Deux observations expérimentales soutiennent cette hypothèse. La première est que les interneurones envahissent le cortex plus tard que les neurones pyramidaux générés au même stade qui sont déjà différenciés dans leur couche corticale (Miyoshi and Fishell, 2011; Pla et al., 2006). Ensuite, l'altération du positionnement normal des neurones pyramidaux modifie le positionnement des interneurones en provenance de l'EGM. Par exemple, un arrêt des neurones pyramidaux au-dessous du corps calleux induit expérimentalement est suffisant pour recruter ectopiquement les interneurones à cet endroit. De plus, l'identité des neurones pyramidaux ectopiques détermine l'identité des interneurones recrutés (Lodato et al., 2011). En résumé, les interneurones pourraient être programmés pour répondre à des signaux spécifiques fournis par les neurones pyramidaux. Cette interaction peut être également réciproque. En effet, une étude récente de Silva et al. montre que le nombre d'interneurones est corrélé à la prolifération des progéniteurs intermédiaires dans le cortex, et que les interneurones régulent la prolifération, donc finalement le nombre de neurones pyramidaux. *In vitro*, les auteurs montrent que cet effet ne nécessite pas de contacts entre les deux populations et se ferait donc plutôt par le biais d'un signal diffusif dont la nature reste encore à déterminer (Silva et al., 2018).

En conclusion, si les mécanismes cellule-autonomes semblent être cruciaux pour le bon positionnement des interneurones, il existe également des mécanismes non cellule-autonomes et des signaux extrinsèques qui régulent ce processus comme le prouvent des expériences de greffes

hétérochroniques où des interneurons générés tardivement transplantés dans des embryons plus jeunes changent leur localisation (Pla et al., 2006). C'est finalement l'ensemble de ces facteurs, intrinsèques et extrinsèques qui détermine le bon positionnement des interneurons corticaux.

### 3.4 Pathologies associées à des défauts de migration des interneurons corticaux

Dans le cerveau adulte, les interneurons sont cruciaux dans la modulation des signaux excitateurs et dans la génération d'oscillations et de synchronie dans les réseaux de neurones pyramidaux. Ainsi des dysfonctionnements des interneurons sont de plus en plus liés à des maladies neuropsychiatriques telles que la schizophrénie, les troubles autistiques, l'épilepsie ou les troubles de l'humeur (Inan et al., 2013; Marín, 2012). Même si des défauts dans la connectivité de ces neurones sont plutôt à l'origine de ces maladies, il est tout à fait probable que des défauts de migration soient également impliqués. Des études chez la souris suggèrent que de nombreux facteurs externes, comme le stress ou les drogues, perturbent cette migration. De plus, un certain nombre de mutations dans des gènes centraux peuvent affecter le nombre et/ou le bon positionnement des interneurons.

Le stress prénatal perturbe la migration et le positionnement des interneurons, sans affecter leur génération ou leur survie. Il a été suggéré que ces défauts sont causés par des changements d'expression de gènes impliqués dans la migration des interneurons corticaux (Stevens et al., 2013). De même, l'exposition pendant la grossesse à la cocaïne, à la caféine ou encore au monoxyde de carbone présent dans la fumée de cigarette modifie la migration de ces cellules (Crandall et al., 2007; McCarthy et al., 2011; Silva et al., 2013; Trentini et al., 2016). L'exposition in utero à l'éthanol quant à lui conduit à une migration tangentielle précoce due à une sensibilité accrue des interneurons au GABA (Cuzon et al., 2008). Ainsi, l'exposition à un certain nombre de drogues pendant la grossesse peut augmenter le risque de développer une pathologie neuropsychiatrique en affectant la migration neuronale.

Des défauts génétiques chez l'humain peuvent également affecter la migration et la distribution des interneurons corticaux. Par exemple, un certain nombre de mutations impliquées dans la lissencéphalie (pathologie impliquant de lourdes malformations du cerveau) engendrent des défauts de migration des interneurons (Bonneau et al., 2002; Marcorelles et al., 2010). On a également observé une réduction du nombre d'interneurons dans le cortex de fœtus atteints du syndrome de Miller-Diecker (Marcorelles et al., 2010; Pancoast et al., 2005). Ces défauts sont probablement liés à une altération de la migration neuronale comme le prouvent les modèles de souris portant les mutations associées à ces syndromes (gènes ARX ou Lis1 impliqués dans la lissencéphalie, (Gopal et al., 2010;

Kitamura et al., 2002)). De la même manière, un modèle de souris du syndrome de DiGeorge montre des défauts de migration des interneurons corticaux PV (Meechan et al., 2012).

On a vu dans ce chapitre que les circuits corticaux sont constitués de deux types de neurones : les neurones excitateurs et les interneurons inhibiteurs qui constituent la minorité des cellules du cortex, mais comprennent une grande variété de sous-types de neurones. La mise en place des circuits dans le cortex dépend donc de la migration de ces deux types de neurones. Si les neurones excitateurs sont générés localement dans les zones prolifératives du cortex et effectuent une courte migration radiale pour se positionner, les interneurons effectuent une migration beaucoup plus longue depuis les éminences ganglionnaires du télencéphale ventral. Cette migration est découpée en plusieurs phases : une première de migration tangentielle en flux jusqu'au cortex, puis une phase de réorientation vers une migration radiale qui permet la dispersion et le bon positionnement de ces cellules au sein du cortex. La migration des interneurons corticaux est cruciale puisque son altération peut engendrer un large spectre de pathologies neurodéveloppementales.



---

## 4 Navigation et guidage des interneurones corticaux

---

### Sommaire

---

#### 4.1 Mécanismes intrinsèques cellulaires et moléculaires

- 4.1.1 Branchement du prolongement de migration
- 4.1.2 La nucléokinèse : un mouvement saltatoire du noyau
- 4.1.3 Mouvements coordonnés et cycle de migration

#### 4.2 Guidage extracellulaire de la migration

- 4.2.1 Sorties des zones prolifératives et initiation de la migration
- 4.2.2 Migration vers le cortex à travers le subpallium
- 4.2.3 Organisation et sélection des voies de migration dans le cortex
- 4.2.4 Réorientation et dispersion dans le cortex
- 4.2.5 Arrêt de la migration

#### 4.3 Environnement extracellulaire de migration

- 4.3.1 Substrat de migration et rôle des molécules d'adhésion
  - 4.3.2 Propriétés physiques de l'environnement extracellulaire
- 

Après avoir évoqué dans le chapitre précédent la migration des interneurones corticaux pendant le développement du cerveau, nous allons maintenant examiner les processus intrinsèques et extrinsèques qui la régissent. En effet, les interneurones présentent une morphologie particulière qui conditionne leur capacité à se mouvoir efficacement. Par ailleurs, les interneurones sont exposés pendant leur déplacement à une combinaison de signaux chimiques répulsifs (dans le télencéphale ventral) et attractifs (dans le cortex) qui guident leur mouvement. Nous finirons par évoquer l'environnement extracellulaire de migration de ces cellules, dont les propriétés et l'influence sur leur migration restent peu connues.

## 4.1 Mécanismes intrinsèques cellulaires et moléculaires

Les interneurons en migration possèdent une morphologie spécialisée et polarisée. Ils étendent depuis le corps cellulaire un long prolongement de migration (ou « leading process ») branché dans la direction de migration, et peuvent également présenter un processus arrière (ou « trailing process »). A l'extrémité du prolongement de migration se trouve un lamellipode particulièrement développé appelé cône de croissance qui, de par son comportement exploratoire, se rapproche de celui du cône de croissance axonal (voir Figure 27).

### 4.1.1 Branchement du prolongement de migration

Contrairement aux neurones excitateurs qui présentent une morphologie bipolaire et un prolongement de migration simple, les interneurons corticaux présentent la particularité d'avoir un prolongement de migration branché, caractéristique qu'ils partagent avec un certain nombre d'autres neurones à migration tangentielle comme les neurones du pont, dans le myelencéphale, et ceux des neuroblastes de la SVZ adulte par exemple (Cooper, 2013; Ward et al., 2005).

Dans des préparations fixées, on observe une variété de morphologies plus ou moins branchées. Dans des co-cultures, environ 65 à 80% des cellules présentent une ou deux bifurcations (Baudoin et al., 2008). Dans des tranches de cerveau fixées, presque 60% des cellules observées sont unipolaires, environ 35% possèdent une bifurcation, et moins de 10% montrent deux bifurcations et plus (Baudoin et al., 2012). Ces résultats indiquent une intense dynamique de remodelage du prolongement au cours de la migration des interneurons. Un prolongement principal de structure dichotomique est le plus souvent décrit, pouvant présenter des ramifications secondaires. L'extrémité de chaque branche porte un cône de croissance plus ou moins important.

Les sites de formation de ces branches ne sont pas précisément établis. Certaines études décrivent une division du cône de croissance à l'avant du prolongement qui résulte en la formation d'une ramification (Bellion et al., 2005; Godin et al., 2012; Kappeler et al., 2006; Lysko et al., 2011). D'autres mentionnent la naissance de bifurcations le long du prolongement de migration principal déjà existant (Bellion et al., 2005; Kappeler et al., 2006; Lysko et al., 2011; Martini et al., 2009; Polleux et al., 2002) (Figure 25A). On peut également observer la présence de plusieurs branches autour du corps cellulaire. Cette configuration semble dans la majorité des cas résulter de l'avancée du noyau jusqu'à la bifurcation entre deux branches existantes, bien qu'un prolongement de migration puisse également se former à partir du soma dans la direction opposée au mouvement, entraînant ainsi une inversion de polarité et de

direction de migration (Martini et al., 2009; Polleux et al., 2002; Tanaka et al., 2009; Yanagida et al., 2012).

Le prolongement de migration des neurones en migration présente des similarités morphologiques et fonctionnelles avec un axone en croissance. Chez les axones, le cône de croissance est un organe sensoriel et protrusif qui sonde l'environnement extracellulaire. Il détecte notamment des gradients de molécules de guidage et tourne progressivement vers ou à l'opposé de la source du gradient. Ce virage s'effectue par une élongation asymétrique du cône de croissance qui réoriente progressivement l'axone (Ward et al., 2005). Dans le cas des interneurons en migration, un mouvement relativement linéaire du cône de croissance a été rapporté (Valiente and Martini, 2009; Yanagida et al., 2012), indiquant que ces neurones utilisent un autre mode d'exploration de l'espace.

Il a été suggéré que le branchement du prolongement des neurones en migration constituait un mode d'exploration de l'environnement efficace, dans lequel les différentes branches peuvent détecter des signaux dans un périmètre bien plus important qu'un seul cône de croissance (Cooper, 2013). Britto et al. ont cherché à comprendre et modéliser la dynamique de branchement des interneurons à partir d'enregistrements en temps réel, et ont montré que le branchement est un processus stochastique d'exploration optimale, récapitulé par un modèle « birth-death », où l'extension/rétraction d'une branche est indépendante des événements de bifurcations passés (Britto et al., 2009). *In vivo*, on observe que les processus de naissance et de mort des branches sont très dynamiques, avec certaines branches stabilisées plus longtemps que d'autres, qui déterminent la direction du mouvement. Ainsi, contrairement aux axones en croissance ou aux neurones en migration non branchés, les interneurons corticaux changent de direction de mouvement grâce à la formation active de nouvelles branches. Martini et al. montrent dans des cultures de tranches organotypiques que lors d'un mouvement unidirectionnel, la distribution des angles de branchement suit une distribution gaussienne, et la probabilité que le noyau transloque dans l'une ou l'autre des branches est de 50%. A l'inverse, la formation et la stabilisation de branches divergentes par rapport à l'axe principal de migration permet à la cellule de changer de direction (Valiente and Martini, 2009) (Figure 25B).

Le branchement du prolongement de migration apparaît comme un processus stochastique et intrinsèque. Ainsi, on peut observer un branchement spontané et périodique en l'absence de contacts cellulaires ou de signaux extérieurs (chez des neurones granulaires du cervelet, (Kumada et al., 2008)). Néanmoins, *in vivo*, les signaux extrinsèques modulent fortement ce processus et la stabilisation de nouvelles branches est liée aux signaux de guidage présents dans l'environnement. En particulier, Martini et al. montrent qu'en présence de Neureguline1 (Nrg1), un facteur attractif, les interneurons étendent et stabilisent une branche dans la direction de la source de Nrg1. Ainsi l'angle des branches

formées augmente ( $>60^\circ$  en moyenne) en réponse à une source placée perpendiculairement à la direction de migration. Les cellules rétractent les branches non orientées vers la source et le noyau avance dans la branche la mieux alignée dans la direction de la source attractive (Martini et al., 2009). Le comportement dynamique de branchement au niveau du prolongement de migration est donc nécessaire au chimiotactisme des interneurons corticaux.

*In vivo*, les interneurons dans les flux de migration tangentiels présentent une morphologie plutôt bipolaire (Martini et al., 2009), tandis que la migration aléatoire observée dans la zone marginale du cortex est associée à des morphologies très branchées ou multipolaires (Tanaka et al., 2009) (Figure 25C). En particulier, la réorientation des interneurons des flux tangentiels vers la plaque corticale implique la formation de nouvelles branches à des angles relativement importants ( $60$  à  $90^\circ$ ) (Martini et al., 2009; Polleux et al., 2002). Ainsi, la présence d'agents perturbateurs du branchement (tel que Y27632, inhibiteur de ROCK) entraînent des défauts d'invasion de la plaque corticale (Martini et al., 2009). A l'inverse, la stimulation de la formation des branches (par blocage du signal SDF1) conduit à une invasion prématurée de la plaque corticale (Lysko et al., 2011). De manière générale, une majorité des signaux de guidage (que nous allons détailler par la suite) semblent agir sur le mouvement et la direction des interneurons en modulant le branchement du prolongement de migration.

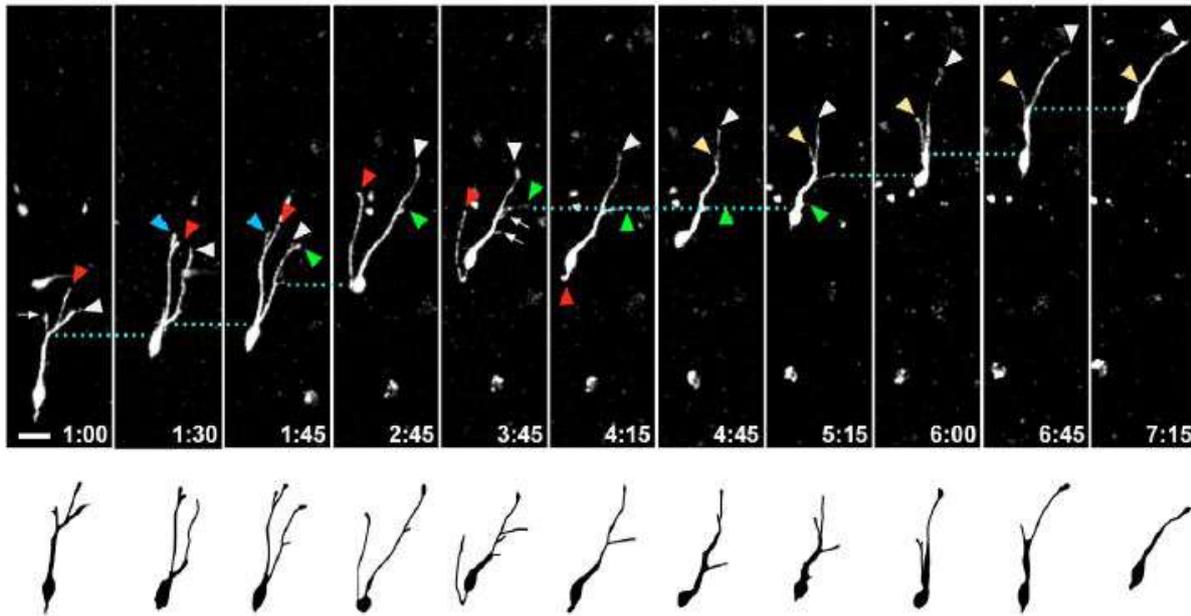
Au niveau subcellulaire, le prolongement des interneurons est formé par des faisceaux denses de microtubules (MT), stables et dynamiques comme le montrent des immunomarquages révélant la tubuline acétylée/détyrosinée (MT stables) ou tyrosinée (MT dynamiques) (Baudoin et al., 2008; Gopal et al., 2010; Lysko et al., 2014). La déstabilisation légère des microtubules par l'utilisation de nocodazole à faibles doses provoque le raccourcissement des prolongements de migration et la diminution du nombre de branches formées. En cas de forte déstabilisation par des doses plus importantes de cette drogue, les cellules étendent des prolongements fins et labiles, et adoptent une morphologie multipolaire avec l'apparition de plusieurs branches depuis le soma. Dans les deux cas, le nombre d'inversions de polarité est augmenté, et la direction de migration fortement perturbée (Baudoin et al., 2008). Ces éléments indiquent un rôle important des microtubules dans l'élongation du prolongement, ainsi que dans le maintien de la polarité cellulaire et d'une migration dirigée.

Des protéines associées à la régulation des microtubules interviennent également dans les processus d'élongation et de branchement du prolongement. La doublecortine (Dcx) est une protéine associée aux microtubules qui assure leur polymérisation et leur stabilisation (Francis et al., 1999; Horesh et al., 1999). Elle a été en particulier impliquée dans la stabilisation des MT à la base du cône de croissance nécessaire pour l'élongation de l'axone (Friocourt et al., 2003). Les interneurons invalidés pour Dcx présentent une augmentation des divisions du cône de croissance, une fréquence de branchement plus

importante mais formant des prolongements plus courts et peu stables (Kappeler et al., 2006). Les mêmes types de défauts ont été observés sur des interneurons corticaux invalidés pour p27, une protéine associée aux microtubules qui promeut leur élongation dans les neurites (Godin et al., 2012). Lis1 est une protéine qui s'associe avec la dynéine, impliquée dans le couplage du centrosome et du noyau, mais également dans la régulation de la dynamique des MT (Han et al., 2001; Sapir et al., 1997; Shu et al., 2004). L'invalidation de Lis1 conduit à un prolongement de migration plus long et moins branché, dû à un défaut de stabilisation des branches. Par ailleurs, le prolongement de migration présente une expression réduite des microtubules acétylés (Gopal et al., 2010; Mcmanus et al., 2004; Nasrallah et al., 2006). Ainsi, l'élongation du prolongement, la formation, la stabilisation et la rétraction de branches apparaissent intimement liés à la dynamique des microtubules.

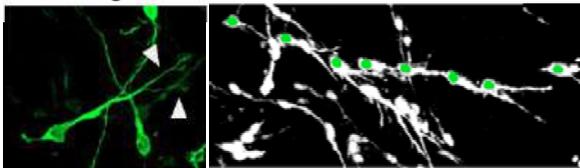
Une concentration d'actine et de myosine II a été observée à l'extrémité du prolongement de migration au niveau du cône de croissance (Bellion et al., 2005; Godin et al., 2012; Lysko et al., 2014). Par ailleurs, des études ont montré une implication de Rho/ROCK (qui promeut la contractilité en phosphorylant la chaîne légère de la myosine II) dans la régulation de l'élongation du prolongement de migration dans des neurones du cervelet, par un mécanisme impliquant Rac (Causeret et al., 2004). De plus, dans les interneurons corticaux invalidés pour p27, les défauts de branchement observés sont annulés par l'application de drogues diminuant l'activité de la myosine II, impliquant là encore la voie ROCK (Godin et al., 2012). Ces résultats suggèrent ainsi que le système d'acto-myosine est également impliqué dans la dynamique de branchement des interneurons corticaux, potentiellement lors des divisions du cône de croissance où il est localisé.

## A Branchement dynamique du prolongement de migration des interneurones corticaux

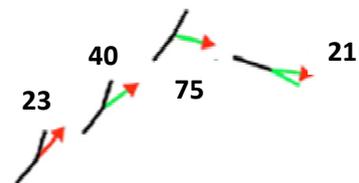
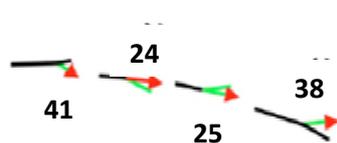
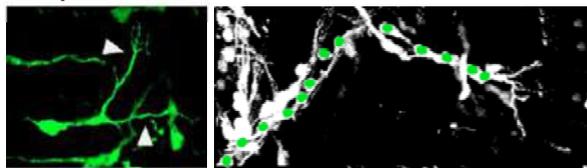


## B La formation de branches divergentes permet des changements de direction

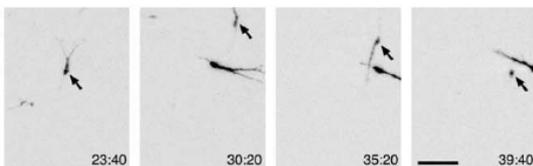
## Flux tangentiels



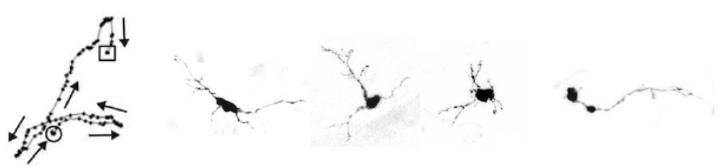
## Plaque corticale



## C Mouvement aléatoire dans la zone marginale



## Morphologies cellulaires observées



## Figure 25 | Branchement du prolongement de direction des interneurones corticaux

(A) Séquence dynamique d'un interneurone en migration dans une tranche de cerveau illustrant le branchement du prolongement de migration au cours du temps (7h de mouvement) (Martini et al., 2009) (B) Gauche: dans les flux de migration tangentiels (ici à la sortie de l'EGL), les interneurones forment des branches à angle faible par rapport à la direction du mouvement et du prolongement principal. Droite : la réorientation vers la plaque corticale implique la formation de branches à des angles plus importants (Martini et al., 2009) (C) Dans la zone marginale, certains interneurones montrent un mouvement aléatoire associé à des morphologies branchées ou multipolaires (Tanaka et al., 2009).

### 4.1.2 La nucléokinèse : un mouvement saltatoire du noyau

A l'arrière du prolongement de migration, le noyau présente un mouvement saltatoire caractéristique des interneurons en migration. Ce mouvement appelé nucléokinèse se produit selon une succession d'étapes impliquant des transformations morphologiques. Tout d'abord, une dilatation cytoplasmique se forme 15 à 30µm à l'avant du corps cellulaire. L'appareil de Golgi et le centrosome avancent dans cette dilatation (Bellion et al., 2005). Puis le noyau s'allonge et avance vers la dilatation, puis reprend sa forme arrondie. Ce mouvement constitue l'étape de translocation nucléaire (Figure 26A). Enfin, le matériel cellulaire resté à l'arrière du noyau est rétracté, laissant un processus arrière plus ou moins long (Bellion et al., 2005; Martini and Valdeolmillos, 2010). Ce type de translocations nucléaires a également été décrit dans d'autres types de neurones à migration radiale ou tangentielle, comme par exemple les neuroblastes de la SVZ adulte, les neurones granulaires du cervelet ou les neurones excitateurs du cortex (Schaar and McConnell, 2005; Solecki et al., 2004; Tsai et al., 2007).

Le centrosome est le principal centre organisateur des microtubules dans les neurones en migration et organise le réseau de microtubules autour du noyau (Tsai et al., 2007). Il constitue donc un point central dans la traction du noyau. Ainsi, l'inactivation de Lis1, impliqué entre autres dans le couplage entre centrosome et noyau, conduit à des défauts de nucléokinèse (Mcmanus et al., 2004; Shu et al., 2004). Lis1 pourrait stimuler la dynéine qui, ancrée à la membrane du prolongement ou du noyau, tire le centrosome ou le noyau vers l'avant en s'appuyant sur le réseau de MT émanant du centrosome (Tsai et al., 2007).

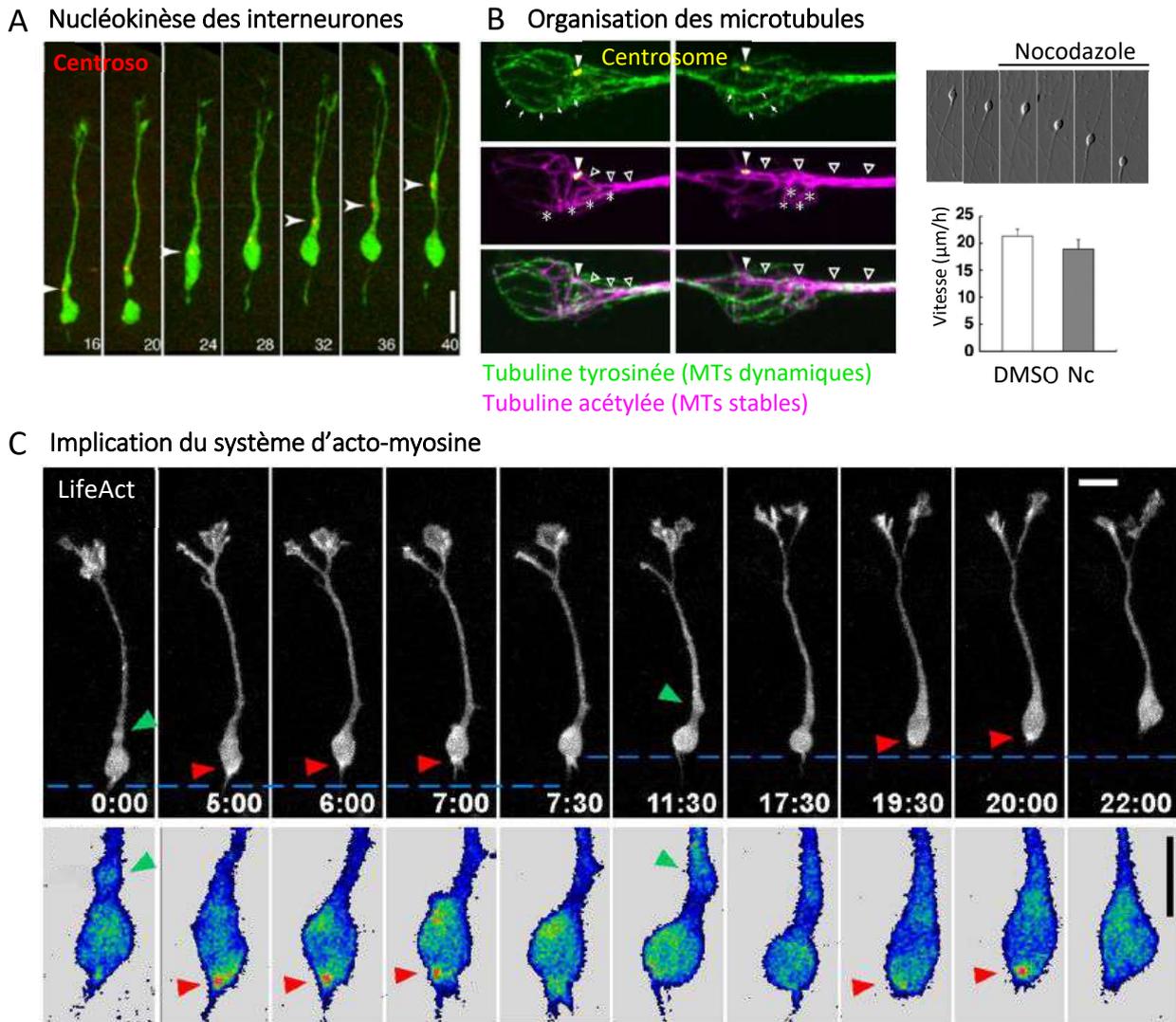
Plusieurs études nuancent néanmoins ce rôle central du centrosome dans la nucléokinèse. Différents travaux montrent pour commencer l'existence de microtubules non reliés au centrosome dans des neurones en migration (Baudoin et al., 2012; Umeshima et al., 2007). Ces microtubules extra-centrosomiaux peuvent être nucléés au niveau de l'appareil de Golgi, ou du noyau lui-même (de Forges et al., 2012; Ori-McKenney et al., 2012). Par ailleurs, ces mêmes études rapportent que le mouvement du centrosome est, à l'inverse de celui du noyau, relativement constant, et qu'il se laisse ainsi régulièrement dépasser et à l'arrière du corps cellulaire (Distel et al., 2010; Umeshima et al., 2007). Le mouvement du centrosome et son positionnement par rapport au noyau semblent donc importants mais néanmoins très complexes.

Le rôle des microtubules dans la nucléokinèse reste lui aussi mal éclairci. Comme mentionné précédemment, les microtubules forment autour du noyau une cage dite péri-nucléaire (Figure 26B). Cette organisation concerne en particulier les microtubules tyrosinés (dynamiques), tandis que les microtubules stables semblent moins présents dans cette zone (Baudoin et al., 2008) (Figure 26B). Dans

des cultures *in vitro* de neurones en migration, la nucléokinese n'est pas affectée par l'application de nocodazole, qui déstabilise les microtubules (Baudoïn et al., 2008; Martini and Valdeolmillos, 2010; Schaar and McConnell, 2005; Umeshima et al., 2007) (Figure 26B). En revanche, la présence de taxol, un agent stabilisateur des MT, bloque les mouvements nucléaires (Martini and Valdeolmillos, 2010; Schaar and McConnell, 2005; Umeshima et al., 2007). Ces résultats indiquent l'importance d'une balance précise et complexe entre les différents réseaux de microtubules stables et dynamiques dans la régulation des mouvements nucléaires.

L'implication du système d'acto-myosine dans la nucléokinese est quant à lui plus clair. Quand le noyau est immobile, on observe une faible concentration d'actine, distribuée de manière homogène dans le corps cellulaire. Lors de la translocation nucléaire, l'actine et la myosine II s'accumulent à l'arrière du noyau dans une forme de croissant (Bellion et al., 2005; Martini and Valdeolmillos, 2010) (Figure 26C). Cette accumulation apparaît quelques dizaines de secondes avant le mouvement du noyau, persiste pendant toute la durée de la translocation et disparaît en un point à l'arrière du noyau (Martini and Valdeolmillos, 2010). L'actine et la myosine semblent aussi s'accumuler à l'avant du noyau pendant la nucléokinese, suggérant un rôle complémentaire de ce système contractile. Dans un autre modèle de migration tangentielle, il a été proposé que l'acto-myosine à l'avant du noyau puisse intervenir dans la séparation entre le noyau et le centrosome (Shinohara et al., 2012). Ainsi, l'application de blebbistatine, un inhibiteur de la myosine II, entraîne une immobilisation du noyau dans les interneurons corticaux (Bellion et al., 2005; Martini and Valdeolmillos, 2010). La voie de signalisation Rho/ROCK, de par son implication dans la régulation de la contractilité de l'acto-myosine, influence également les mouvements nucléaires. Ainsi, l'application de Y27632 sur des tranches de cerveau dans l'étude de Martini et al. entraîne des défauts de nucléokinese des interneurons corticaux (Martini et al., 2009).

Dans les interneurons corticaux, l'application de taxol qui stabilise les MT entraîne une forte diminution de l'accumulation de l'actine à l'arrière du noyau (Martini and Valdeolmillos, 2010). De manière similaire, un traitement au nocodazole sur des neuroblastes à migration tangentielle induit la formation de déformations membranaires à l'arrière de la cellule dans lesquelles s'accumulent des filaments d'actine (Schaar and McConnell, 2005). Il est donc très probable que les microtubules et le système d'acto-myosine interagissent et coopèrent dans la nucléokinese, et plus largement dans la migration neuronale.



**Figure 26 | Mouvements nucléaires pendant la migration des interneurons corticaux**

(A) Séquence dynamique (40 minutes) d'un interneurone en migration (vert) illustrant la formation d'une dilatation cytoplasmique dans laquelle se déplace le centrosome (rouge) suivie de la translocation nucléaire. Echelle 10µm (Baudoin et al., 2012) (B) Gauche : organisation des microtubules dynamiques (tyrosinés) et stables (acétylés) autour du noyau dans des neurones granulaires du cervelet. Droite : l'application de nocodazole ne perturbe pas les mouvements nucléaires sur des neurones granulaires en culture (Umeshima et al., 2007) (C) Haut : dynamique de l'actine (électroporation de LifeAct dans l'EGM à E13,5) pendant le cycle de migration (22 minutes). Bas : la représentation en fausses couleurs des niveaux d'actine montre une accumulation d'actine à l'arrière du noyau (rouge) immédiatement avant la nucléokinèse. Echelle 10µm (Martini and Valdeolmillos, 2010).

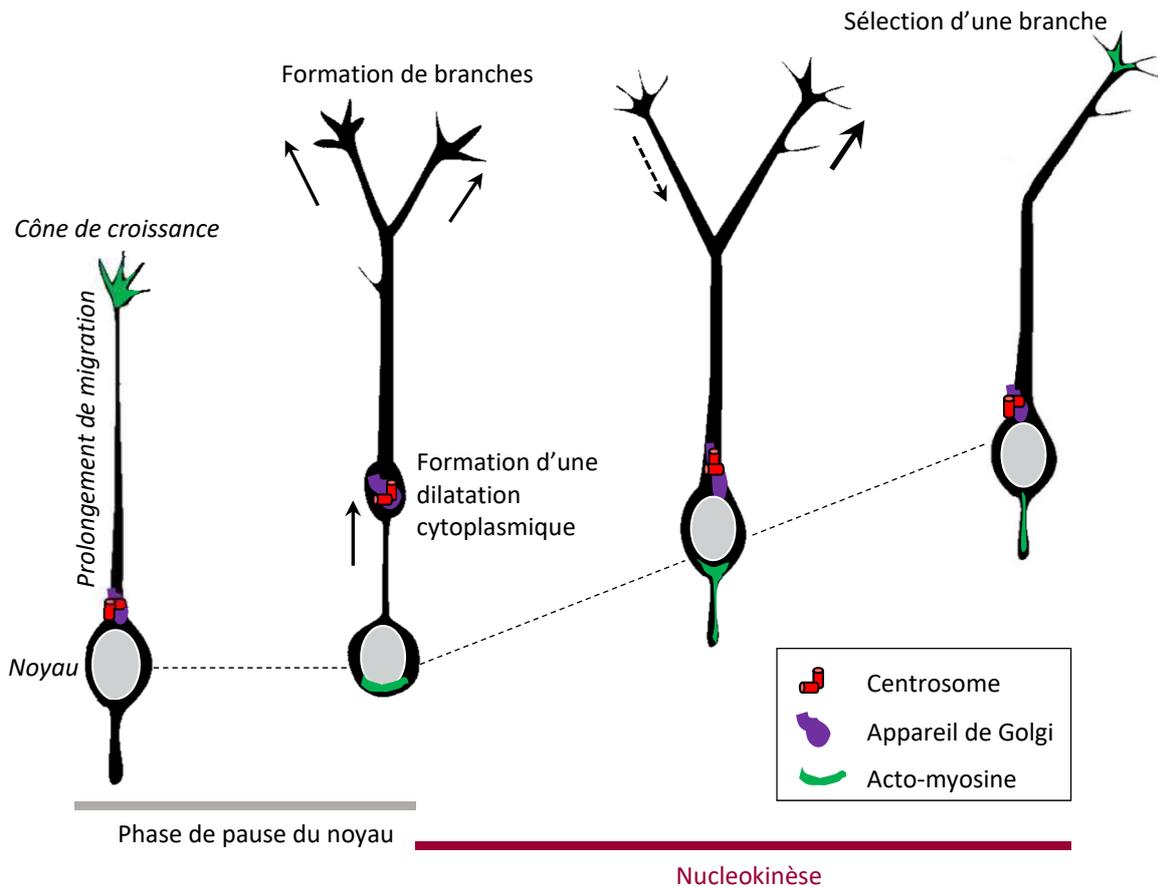
### 4.1.3 Mouvements coordonnés et cycle de migration

La succession et le couplage des transformations morphologiques se déroulant à l'avant et à l'arrière de la cellule définissent finalement un cycle de migration que les interneurons répètent de manière cyclique pour avancer (Figure 27).

Les processus morphologiques et moléculaires distincts à l'avant et à l'arrière de la cellule reflètent une certaine indépendance de ces deux modules. Même si cette distinction morphologique et fonctionnelle est indéniable, il existe toutefois un couplage entre l'avant et l'arrière de la cellule. Ainsi, l'endommagement spécifique du cône de croissance dans des neurones en grain du cervelet entraîne un arrêt du mouvement du noyau (He et al., 2010).

Par ailleurs, certaines observations permettent de corréliser la dynamique de branchement à l'avant aux mouvements nucléaires à l'arrière. Il apparaît ainsi que l'élongation et le branchement du prolongement de migration sont ralentis pendant la translocation nucléaire (Bellion et al., 2005). Finalement, ces différentes observations ont permis d'établir un cycle de migration stéréotypé que l'on peut découper en trois étapes majeures : l'avancée du centrosome dans une dilatation membranaire concomitante à la création et stabilisation de branches, la translocation du noyau dans la branche stabilisée suivie de la rétraction du processus arrière et des branches non choisies (Figure 27).

Certains microtubules extra-centrosomaux entourant le noyau peuvent être observés se prolongeant dans le prolongement de migration (Baudoin et al., 2012), fournissant un lien physique entre l'avant et l'arrière de la cellule. Dans cette optique, le centrosome pourrait ainsi constituer un lien fonctionnel entre ces deux régions. De manière générale, une communication fonctionnelle entre l'avant et l'arrière de la cellule semble essentielle pour relayer les signaux de guidage, assurer une bonne coordination des différentes régions et générer finalement un mouvement efficace et orienté.



**Figure 27 | Cycle de migration des interneurones corticaux**

La migration des interneurones corticaux s'effectue par la répétition d'une succession d'étapes associées à d'importants remodelages morphologiques. Pendant les phases de pause du noyau, le centrosome et appareil de Golgi avance dans une dilatation cytoplasmique, pendant que prolongement de migration branche à l'avant. Pendant la nucléokinèse, qui fait intervenir la contractilité de l'acto-myosine à l'arrière, le noyau rejoint le centrosome. La sélection d'une branche à l'avant détermine la direction de la migration.

## 4.2 Guidage extracellulaire de la migration

Tout au long de leur parcours, les interneurones corticaux sont guidés par un certain nombre de signaux dans leur environnement qui leur permettent de se déplacer et de s'orienter correctement.

### 4.2.1 Sortie des zones prolifératives et initiation de la migration

Immédiatement après leur génération par un progéniteur apical de la zone ventriculaire des éminences ganglionnaires, les jeunes interneurones se regroupent autour des fibres de glie radiaire et quittent les zones prolifératives (Brown et al., 2011). Cette sortie est initiée par une combinaison de facteurs

motogéniques et de molécules de guidage répulsives (Figure 28). En particulier, les molécules diffusibles Slit, connues pour leur action répulsive sur les axones en croissance, ont également été impliquées *in vitro* dans la répulsion des interneurons hors des EG (Zhu et al., 1999a), bien que ces résultats n'aient pas été démontrés *in vivo* (Marín et al., 2003). Une étude plus récente a montré qu'une autre molécule de guidage répulsive, EphrineA5, participe également à la sortie des interneurons des zones prolifératives. EphrineA5 est exprimée dans les zones ventriculaires des EG, et son récepteur EphA4 dans les jeunes interneurons. Des expériences *in vitro* montrent qu'une diminution de l'expression d'EphrineA5 dans la ZV des EG conduit à une invasion ectopique d'interneurons dans cette région. A l'inverse, l'évitement de cette zone est restauré par l'application exogène de la protéine recombinante EphrineA5 (Zimmer et al., 2008). A leur sortie des EG, l'activité répulsive de l'EphrineB3 sécrétée dans l'APO empêche les interneurons exprimant son récepteur EphA4 de migrer ventralement et les oriente dorsalement vers le cortex (Zimmer et al., 2011) (Figure 28).

En parallèle de ces signaux répulsifs, différents facteurs motogéniques stimulent la migration des jeunes interneurons. Par exemple, l'altération du facteur HGF/SF (« hepatocyte growth factor/scatter factor ») conduit à des défauts de motilité et une migration réduite des interneurons dans le cortex (Powell et al., 2001). D'autres facteurs comme le BDNF (« brain derived neurotrophic factor »), la neurotrophine 4 (NT4) ou le GDNF (« glial derived neurotrophic factor ») ont également été identifiés comme stimulant la migration des interneurons dans les EG (Polleux et al., 2002; Pozas and Ibáñez, 2005). Ici encore, des preuves directes de leur action *in vivo* manquent, mais plusieurs expériences *in vitro* sur des cultures ou des tranches de cerveau ont clairement montré leur influence sur la motilité cellulaire (Behar et al., 1997; Polleux et al., 2002; Powell et al., 2001; Pozas and Ibáñez, 2005). Les mécanismes sous-jacents restent encore mal compris mais pourraient impliquer les voies de signalisation PI3K/AKT et ERK (Polleux et al., 2002).

#### 4.2.2 Migration vers le cortex à travers le subpallium

Sur leur route vers le cortex, les interneurons en migration contournent le striatum en développement. Cet évitement implique là encore des facteurs de guidage répulsifs. Au niveau du striatum sont présentes les protéines répulsives sémaphorines Sem3A et Sem3F (Figure 28). Ces molécules sont responsables du tri entre les interneurons destinés au cortex, qui expriment les récepteurs aux sémaphorines Nrp1 et 2 et contournent donc le striatum, et les interneurons destinés au striatum qui ne les expriment pas et ne sont donc pas sensibles à l'activité répulsive de cette région. De manière intéressante, le facteur de transcription Nkx2.1 exprimé dans l'EGM contrôle directement les niveaux de Nrp. Ainsi, la diminution de l'expression de Nkx2.1 à la sortie de l'EGM rend les interneurons

sensibles à l'action répulsive des sémaphorines dans le striatum et participe à leur bonne orientation dans des voies de migration spécifiques (Marín et al., 2001).

Si le subpallium ventral constitue de manière générale un environnement non permissif dans lequel les interneurons corticaux passent mais ne s'arrêtent pas, le cortex dorsal constitue lui un environnement attractif et permissif pour ces cellules (Marín et al., 2003; Wichterle et al., 2003). Deux isoformes de Neureguline 1 (Nrg1), une forme liée à la membrane (CRD-Nrg1) et une forme diffusible (Ig-Nrg1), constituent respectivement un facteur permissif local et un facteur de guidage attractif à longue distance pour les interneurons corticaux. CRD-Nrg1 est exprimé dans le subpallium et forme un corridor permissif depuis l'EGM jusqu'à la frontière pallium-subpallium. Ig-Nrg1 est quant à lui libéré dorsalement dans le cortex et attire les interneurons à leur passage de cette frontière (Figure 28). L'action de Nrg1 s'effectue par l'intermédiaire des récepteurs ErbB4 exprimés par les interneurons en migration. Ainsi, la perturbation de la fonction d'ErbB4 diminue le nombre d'interneurons qui entrent dans le cortex (Bartolini et al., 2017; Flames et al., 2004; Yau et al., 2003).

Par ailleurs, différents neurotransmetteurs comme le GABA, la glycine, le glutamate, la dopamine ou la sérotonine peuvent également avoir une influence sur la migration des interneurons et promouvoir leur entrée dans le cortex (Bortone and Polleux, 2009; Crandall et al., 2007; Cuzon et al., 2006; Inada et al., 2011; López-Bendito et al., 2003; Manent et al., 2006; Riccio et al., 2009). La glycine se fixe aux récepteurs GlyR et régule la vitesse de migration et la nucléokinèse des interneurons en contrôlant la contractilité de l'acto-myosine. Une perte de la fonction de GlyR perturbe l'entrée des interneurons dans le cortex tandis qu'à l'inverse, une surexpression du récepteur promeut l'invasion du cortex (Avila et al., 2013). Les interneurons en migration expriment des récepteurs au GABA (López-Bendito et al., 2003). Des études *in vivo* et *in vitro* utilisant des antagonistes spécifiques des récepteurs GABA A suggèrent que la GABA stimule la migration des interneurons et leur entrée dans le cortex (Bortone and Polleux, 2009; Cuzon et al., 2006). Le blocage des récepteurs GABA B induit quant à lui l'accumulation des interneurons dans la ZSV du cortex et un défaut de colonisation de la plaque corticale, suggérant un rôle de ce neurotransmetteur dans la réorientation des interneurons (López-Bendito et al., 2003). Les interneurons expriment également différents récepteurs au glutamate et il a été montré que le glutamate affecte la migration des interneurons via les récepteurs AMPA mais pas NMDA (Manent et al., 2006; Métin et al., 2000). Une action différentielle des récepteurs à la dopamine régule la migration des interneurons depuis les EG jusqu'au cortex : le récepteur D1 promeut tandis que le récepteur D2 diminue la migration (Crandall et al., 2007).

### 4.2.3 Organisation et sélection des voies de migration dans le cortex

A leur arrivée dans le cortex, les interneurons s'organisent en flux, superficiel au niveau de la zone marginale (ZM) et profond au niveau de la ZSV/ZI, en évitant la plaque corticale aux stades précoces de développement. Une activité chémoréulsive dans cette région du cortex semble être en partie responsable de la migration préférentielle dans ces voies (López-Bendito et al., 2008). Les interneurons migrent donc plutôt dans des couches dont les cellules expriment des molécules qui facilitent la migration, comme par exemple Cxcl12. Cxcl12 est exprimé par les leptoméniges, par les progéniteurs intermédiaires dans la ZSV et plus faiblement par les cellules de la sous-plaque (Stumm et al., 2003; Tiveron et al., 2006) (Figure 28). Cxcl12 est un puissant signal attractif qui, associé à de faibles propriétés diffusives, attire et maintient les interneurons dans les flux de migration en réduisant le branchement (Li et al., 2008a; López-Bendito et al., 2008; Lysko et al., 2011). Appuyant cette idée, des lignées de souris où l'expression de Cxcl12 est inhibée dans les méninges ou la ZSV montrent des défauts de migration des interneurons spécifiques à la voie de migration affectée (superficielle ou profonde respectivement) (Tiveron et al., 2006; Zarbalis et al., 2012). Dans ces cellules, deux récepteurs, Cxcr4 et Cxcr7, assurent la transduction du signal Cxcl12. En l'absence de l'un de ces deux récepteurs, les interneurons en migration ne sont plus confinés en flux et on observe une invasion prématurée de la plaque corticale (Li et al., 2008a; López-Bendito et al., 2008; Tiveron et al., 2006; Wang et al., 2011). Il est important de noter que dans les mutants pour Cxcr4 et Cxcr7, les interneurons arrivent néanmoins correctement à la frontière pallium-subpallium, ce qui indique un effet spécifique de ce signal au niveau du cortex, et de manière plus générale des mécanismes de guidage différents dans le subpallium et le pallium.

Le confinement des interneurons corticaux en flux migratoires semble donc assuré en partie par l'action de signaux chimiques extrinsèques, mais pourrait également impliquer des mécanismes intrinsèques, en particulier pour le choix de la voie de migration. Il apparaît en effet que les interneurons ne se distribuent pas aléatoirement dans les différents flux, mais montrent à l'inverse des préférences pour l'un ou l'autre. Une étude d'Antypa et al. montre des profils d'expression génique différents pour les interneurons migrant dans la ZM ou la ZSV, et en particulier pour des récepteurs de molécules de guidage (Antypa et al., 2011). Par ailleurs, une étude a montré que des interneurons où l'interaction du récepteur aux intégrines  $\alpha 3$  avec Nétrine 1 est inhibée (par invalidation de ces deux facteurs) ne parviennent plus à migrer dans la ZM, mais semblent migrer parfaitement dans la ZSV (Stanco et al., 2009). De la même manière, le blocage des récepteurs GABA B change la proportion de cellules dans les différentes voies, avec une accumulation d'interneurons dans la ZSV aux dépens de la

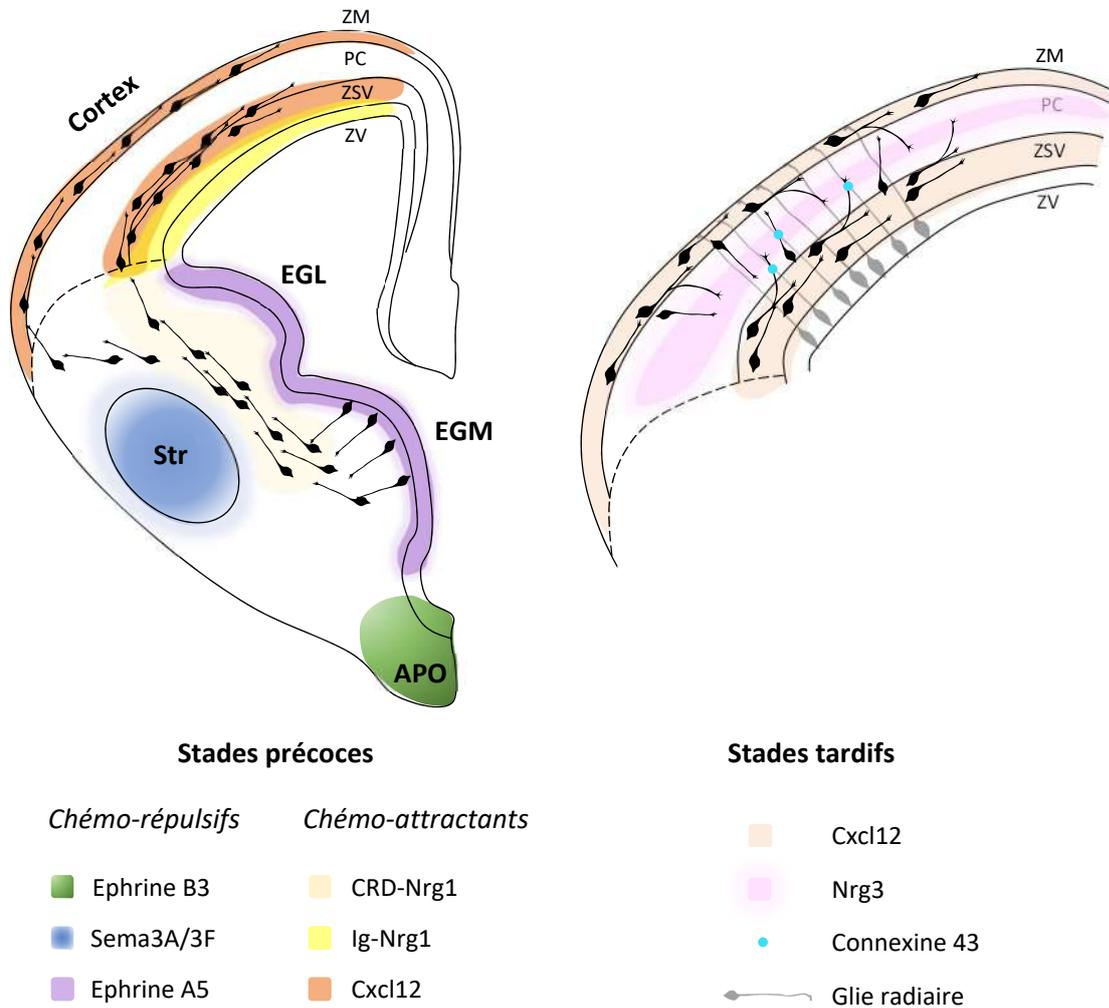
ZM (López-Bendito et al., 2003). A l'inverse, l'altération de la sous-unité  $\alpha 2$  du récepteur GlyR diminue le nombre d'interneurones spécifiquement dans la ZSV (Avila et al., 2013). Ces différents éléments suggèrent qu'un ensemble de facteurs intrinsèques détermine le choix de la voie de migration, en changeant spécifiquement la sensibilité des cellules à différents facteurs externes.

#### 4.2.4 Réorientation et dispersion dans le cortex

Les mécanismes qui régulent la sortie des flux de migration, la réorientation d'une migration tangentielle à radiale et l'invasion de la plaque corticale ne sont toujours pas complètement élucidés. Néanmoins, il a été montré pour commencer que la sortie des voies de migration est associée à une perte de sensibilité à Cxcl12 (Li et al., 2008a) (Figure 28). Une interprétation possible de ce résultat serait celle d'une horloge interne de maturation qui déclencherait de manière cellule-autonome la perte de la réponse à Cxcl12 et le début de la réorientation. Cela expliquerait pourquoi les interneurones envahissent progressivement la plaque corticale, en fonction de leur âge (les cellules les plus âgées en premier, les plus nouvellement générées ensuite) (López-Bendito et al., 2008; Pla et al., 2006). En l'absence des récepteurs cxcr4 et cxcr7, les interneurones s'accumulent prématurément dans la plaque corticale (Li et al., 2008a; López-Bendito et al., 2008; Tiveron et al., 2006; Wang et al., 2011), ce qui indique la présence d'un signal attractif dans cette zone. Une étude de Bartolini et al. montre que Nrg3 (Neuréguline 3) est exprimé dans la plaque corticale par les neurones pyramidaux et constitue un signal attractif pour les interneurones. Par ailleurs les auteurs montrent que le signal Cxcl12 est plus attractif que Nrg3, ce qui expliquerait pourquoi les cellules restent en flux tant qu'elles sont sensibles à Cxcl12, puis sont attirées par Nrg3 dans la plaque corticale. Ainsi, une surexpression de Nrg3 accélère l'invasion de la PC par les interneurones (Bartolini et al., 2017).

D'un point de vue cellulaire, les interneurones corticaux pourraient, lors de ce changement de direction de migration, s'appuyer sur les fibres de glie radiale. En effet, des interactions dynamiques ponctuelles entre les deux types de cellules ont été observées. Pour une partie des interneurones, ces contacts promeuvent un changement de trajectoire vers la PC (Yokota et al., 2007). La protéine d'adhésion connexine 43 (CX43) est nécessaire pour cette interaction entre glie radiale et interneurones, et une délétion de CX43 retarde la réorientation de ces derniers (Elias et al., 2010). Par ailleurs, l'altération des axones thalamo-corticaux, qui partagent des similarités spatiales et temporelles de développement avec les interneurones corticaux, conduit à un défaut d'invasion de la PC et à l'accumulation d'un certain nombre d'interneurones dans les couches profondes du cortex, indiquant que cette structure axonale pourrait fournir des signaux cruciaux pour la dispersion radiale (Zechel et al., 2016).

Comme mentionné précédemment, les changements de direction des interneurons corticaux impliquent le branchement du prolongement de migration, et en particulier la stabilisation d'une branche divergente (Martini et al., 2009). Tous les processus impliqués dans le branchement du prolongement de migration et les transformations du cytosquelette associées peuvent donc potentiellement influencer l'invasion de la plaque corticale. Ainsi, il a été montré par exemple que le blocage pharmacologique du signal Cxcl12 sur des tranches de cerveau augmente la fréquence de branchement et le nombre d'interneurones dans la plaque corticale (Lysko et al., 2011). Dans une étude ultérieure, la même équipe montre que Cxcl12 agit notamment en stabilisant les microtubules dans le prolongement de migration par l'activation de la doublecortine (Lysko et al., 2014). Le signal Sonic Hedgehog (Shh) dont la transduction est assurée par le cil primaire a également été impliqué dans la réorientation des interneurons corticaux. Dans des souris invalidées pour le cil primaire, on observe des défauts d'invasion de la plaque corticale (Baudoin et al., 2012). Le cil primaire a ainsi une place de choix pour la détection et la transduction d'un certain nombre de signaux de guidage, mais également dans les réorganisations du cytosquelette via son ancrage au centrosome.



**Figure 28 | Guidage extrinsèque des interneurons corticaux**

Après leur génération, une combinaison de signaux répulsifs et motogéniques guide les interneurons hors des EG. Le cortex constitue un environnement permissif et attractif vers lequel se déplacent les interneurons. Aux stades précoces de migration, des signaux attractifs dans le cortex comme Cxcl12 maintiennent les interneurons dans les flux de migration. Plus tard, la perte de sensibilité à ces signaux associée à d'autres facteurs conduit à la réorientation des interneurons et à l'invasion de la plaque corticale

### 4.2.5 Arrêt de la migration

Une fois dans la plaque corticale, les interneurons se dirigent vers les régions du cortex appropriées et doivent s'arrêter une fois que leur position finale est atteinte. On a vu précédemment que les neurones excitateurs pouvaient influencer ce processus et la position laminaire des interneurons. En outre, il semble exister des mécanismes intrinsèques régulant cet arrêt de la migration. Pendant la migration, le GABA et le glutamate ont un effet dépolarisant sur les interneurons, ce qui stimule l'activité calcique et ainsi la migration cellulaire (Bortone and Polleux, 2009; Cuzon et al., 2006; Inada et al., 2011; Manent et al., 2006). Au cours du développement post-natal précoce, l'expression du transporteur KCC2 dans les interneurons change l'effet du GABA qui devient hyperpolarisant et diminue la fréquence de l'activité calcique. Il a donc été proposé que ce changement puisse transformer le GABA en signal d'arrêt pour les interneurons (Bortone and Polleux, 2009). Dans les interneurons issus de l'EGC, la surexpression du canal potassique Kir2.1 entre la naissance et le troisième jour post-natal (P0-P3) modifie leur excitabilité et conduit à une accumulation anormale d'interneurons CR dans les couches profondes du cortex (De Marco Garcia et al., 2011). Ces résultats suggèrent que l'activité neuronale des réseaux en formation pourrait également influencer le positionnement final des interneurons corticaux.

## 4.3 Environnement extracellulaire de migration

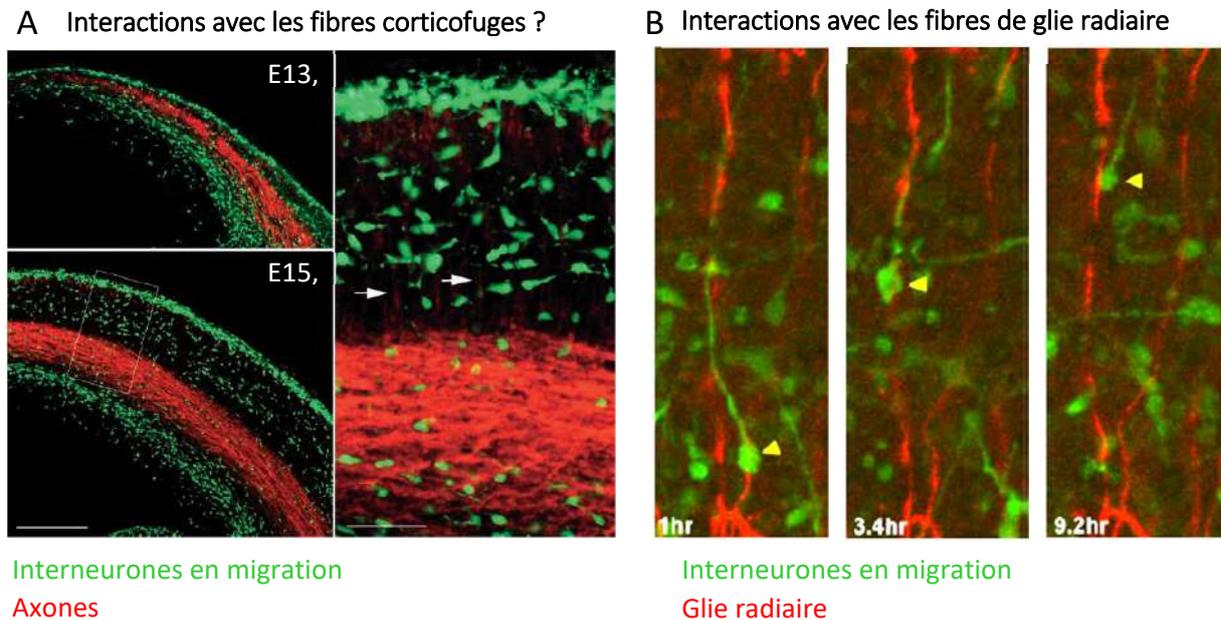
### 4.3.1 Substrat de migration et rôle des molécules d'adhésion

Contrairement aux neurones excitateurs qui parcourent de courtes distances dans le cerveau en développement, les interneurons corticaux parcourent de longues distances et traversent des environnements complexes de composition et d'architecture pouvant être très variables. L'établissement d'adhésions avec l'environnement extracellulaire est indispensable pour les interneurons en migration, mais contrairement aux neurones excitateurs qui établissent ces adhésions de manière préférentielle avec les fibres de glie radiaire, les interneurons corticaux ne semblent pas utiliser un substrat cellulaire unique pour se déplacer.

Les interneurons corticaux peuvent établir des contacts cellule-cellule pour migrer le long de faisceaux de fibres, comme celui du réseau corticofugal qui envahit les EG (Métin and Godement, 1996). Il a été proposé que TAG1, une molécule d'adhésion exprimée par les fibres corticofuges puisse être impliquée dans cette interaction, car une inhibition de TAG1 induit *in vitro* une forte réduction de la migration des interneurons corticaux (Denaxa et al., 2001). Néanmoins, cette idée reste controversée, car l'invalidation de TAG1 *in vivo* ne perturbe pas la migration des interneurons (Denaxa et al., 2005). De

plus, les fibres corticofuges sont localisées dans la ZI du cortex, où les interneurones en migration ne sont pas nombreux (Tanaka et al., 2003; Wichterle et al., 2001) (Figure 29A). Une étude observe que les interneurones générés à des stades précoces de développement (quand la ZI est encore peu développée) établissent des contacts préférentiels avec les axones positifs pour TAG1, tandis que les interneurones nés plus tardivement migrent sur d'autres processus n'exprimant pas TAG1 (McManus et al., 2004). Ces résultats suggèrent l'existence d'une spécificité temporelle dans les interactions entre les interneurones corticaux et l'environnement extracellulaire.

On a évoqué précédemment les contacts entre les interneurones corticaux et les fibres de glie radiaire dans le cortex. Le rôle de ces fibres dans la migration des interneurones est toujours discuté. En effet, des expériences de microscopie électronique et de vidéomicroscopie ont révélé des contacts entre ces deux types cellulaires (Elias et al., 2010; Yokota et al., 2007) (Figure 29B). Néanmoins, on observe également sur des tissus fixés ou par des expériences dynamiques que les prolongements des interneurones en migration ne sont pas systématiquement orientés dans la même direction que les fibres de glie radiaire (Polleux et al., 2002; Yokota et al., 2007). L'hypothèse la plus probable est donc celle d'une migration partielle sur ce support cellulaire.



**Figure 29 | Les interneurones ne montrent pas de substrat de migration préférentiel**

(A) Des immunomarquages de TAG1 dans le cortex en développement révèlent que la majorité des interneurones ne migrent pas dans les zones de passage des fibres corticofuges (Tanaka et al., 2003) (B) Séquence dynamique illustrant un contact entre un interneurone en migration (vert) et une fibre de glie radiaire dans le cortex (rouge) (Yokota et al., 2007).

Les vaisseaux sanguins ont été impliqués dans la migration d'un certain nombre de neurones, et en particulier ceux des neuroblastes de la ZSV adulte vers les bulbes olfactifs (Radial Migratory Stream) (Bovetti et al., 2007; Le Magueresse et al., 2012; Snapyan et al., 2009; Whitman et al., 2009). Bien que le système vasculaire de l'embryon soit moins développé que celui de l'adulte, des données récentes suggèrent une implication des vaisseaux sanguins sur la neurogénèse dans les EG. En particulier, les auteurs observent une association des progéniteurs de glie radiaire du télencéphale ventral avec les vaisseaux sanguins, et montrent que l'altération de cette interaction conduit à des défauts de prolifération et de génération d'interneurones corticaux (Tan et al., 2016).

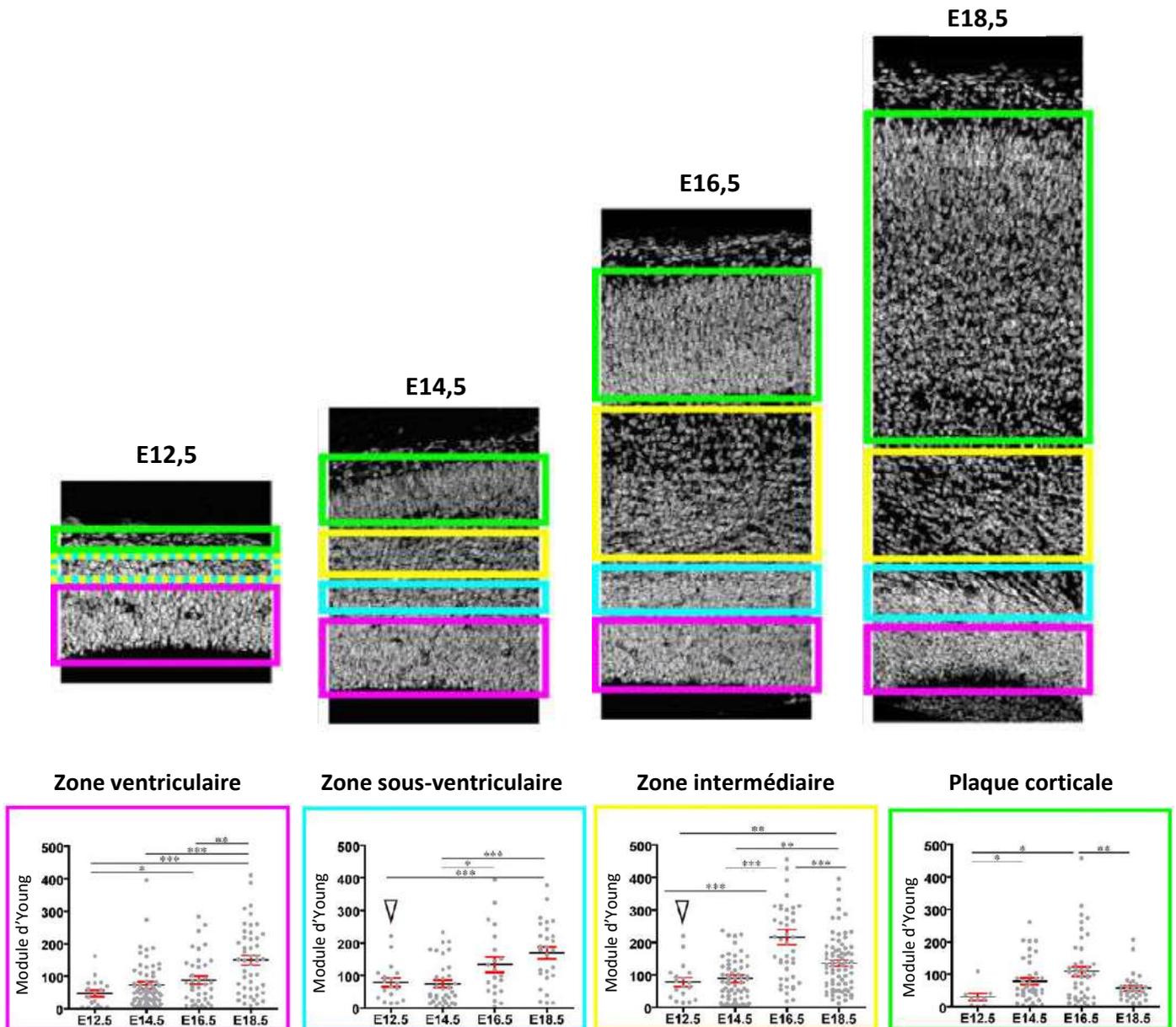
Les interactions cellule-cellule impliquent des molécules d'adhésion homophiliques telles que la N-cadhérine, qui est présente dans les voies de migration des interneurons corticaux et nécessaire à leur migration. Il a été montré *in vitro* que la N-cadhérine promeut la motilité, mais également le maintien de la polarité cellulaire. L'inhibition de la N-cadhérine conduit ainsi à des défauts de motilité et de directionnalité des interneurons, et des défauts d'invasion de la plaque corticale *in vivo* (Luccardini et al., 2013).

Dans le cadre de la migration radiaire, l'adhésion dépendante des intégrines entre les neurones excitateurs et les fibres de glie radiaire est cruciale (Anton et al., 1999), et on a également mentionné l'implication de la connexine 43 (Elias et al., 2010). Le rôle des adhésions cellulaires dans la migration des interneurons corticaux est probablement très important, mais reste néanmoins peu élucidé. Des travaux ont par exemple montré que le mode de migration cellulaire pouvait fortement dépendre du degré d'adhésion dépendante des intégrines, qui joue sur la contractilité de l'acto-myosine à l'arrière de la cellule (Friedl, 2004). D'autre part, il a été montré dans les interneurons corticaux qu'un certain nombre de protéines impliquées dans l'adhésion comme taline, paxiline ou FAK sont des substrats de la calpaïne, une protéase dépendante du calcium (Franco and Huttenlocher, 2005). Dans les interneurons, l'inhibition de la calpaïne réduit la vitesse de migration des interneurons corticaux (Lysko et al., 2014), suggérant que le renouvellement des complexes d'adhésion par clivage est important pour une migration correcte.

#### 4.3.2 Propriétés physiques de l'environnement extracellulaire

Il est important de noter que les neurones en migration se déplacent dans un environnement 3D aux propriétés structurales et biophysiques complexes. Quelques études ont tenté d'examiner la topographie de structures du système nerveux fixées, comme par exemple des axones du nerf sciatique, dont la surface est rapportée plus lisse quand les axones ne sont pas encore myélinisés (Heredia et al., 2007). La catégorisation des différents éléments du cerveau sur une échelle de taille illustre bien la complexité de cette structure. Ainsi, même si elle peut varier en fonction des types cellulaires, la taille

d'un corps cellulaire est proche d'une dizaine de micromètres. A l'inverse, les axones et dendrites ont des diamètres de l'ordre du micromètre (0,2-3 $\mu$ m). Les composants de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, le collagène ou la laminine ont quant à eux des tailles de l'ordre de la centaine de nanomètres. Des études comme celles de Koser et al. ou Iwashita et al. ont utilisé la microscopie à force atomique pour déterminer la rigidité locale dans les cerveaux de xénope et de souris respectivement, et rapportent toutes les deux d'importantes variations de densité locales (Iwashita et al., 2014; Koser et al., 2016). En particulier, l'étude d'Iwashita et al. s'est intéressée au cortex de souris et montre que la rigidité des différentes couches varie au cours du développement. En particulier, la rigidité de la ZV et ZSV augmente graduellement au cours du développement et atteint son maximum à E18,5. Au contraire, celle de la ZI et de la plaque corticale culmine à E16,5 puis diminue (Iwashita et al., 2014) (Figure 30). De manière générale, la rigidité peut dépendre de la rigidité des cellules elles-mêmes, de celle de la matrice extracellulaire mais également de la densité cellulaire, qui varie beaucoup entre les différentes couches du cortex embryonnaire. Il est ainsi probable que l'ensemble de ces paramètres biophysiques affecte la migration neuronale, même si cette idée reste très peu étudiée.



**Figure 30 | Les différentes couches corticales montrent des rigidités différentes et variables au cours du développement**

La rigidité des différentes couches corticales chez l'embryon de souris est mesurée au cours du développement par microscopie à force atomique. Les ZV et ZSV montrent une augmentation graduelle de rigidité au cours du temps, tandis que les ZI et PC montrent un pic de rigidité à E16,5 (Iwashita et al. 2014)

## 5

## Objectifs

D'une manière générale, le développement du cerveau et l'assemblage des circuits neuronaux a longtemps été, et reste encore souvent, envisagé et étudié principalement d'un point de vue biochimique et moléculaire. Ainsi, on place différents signaux chimiques diffusibles (morphogènes, chémoattractants, chémorépulsifs, etc.) ou agissant par contact (molécules d'adhésion, de la matrice extracellulaire) au cœur des différents processus biologiques, allant de la prolifération des progéniteurs jusqu'à la formation de synapses en passant par la migration neuronale. Néanmoins, on voit aujourd'hui apparaître l'émergence de nouveaux courants de pensée qui, en s'appuyant sur une littérature de plus en plus fournie, défendent l'importance de signaux biophysiques et mécaniques dans les processus physiologiques, mais également pathologiques, liés au développement des circuits neuronaux.

Si les premières observations de l'influence de l'environnement physique sur le comportement des cellules sont en réalité anciennes (premières mentions du guidage par contact dès 1914 avec Harrison), les concepts fonctionnels associés, et notamment celui de mécanotransduction, sont assez récents à l'échelle de l'histoire des sciences biologiques et physiques. Ces nouveaux concepts sont particulièrement pertinents dans le cadre de la migration cellulaire. En effet, la cellule en migration est en interaction quasi constante et réciproque avec son environnement, avec lequel elle établit de nombreux contacts. Si l'influence des paramètres physiques de l'environnement extracellulaire semble maintenant bien intégrée dans la vision du mouvement et du guidage d'un grand nombre de types cellulaires, cette notion reste très peu étudiée dans le cadre de la migration neuronale.

Les interneurons corticaux sont un des types de neurones qui parcourent les plus longues distances dans le cerveau en développement, et pour lesquels la notion de guidage est donc particulièrement cruciale. Comme on l'a détaillé en introduction, un certain nombre de signaux chimiques ou adhésifs qui orientent ces cellules dans leur déplacement ont été identifiés. Néanmoins, si l'importance de la forme et de la distribution des indices physiques et adhésifs dans l'environnement (que l'on regroupe sous le terme générique de topographie) a été démontrée pour de nombreuses cellules, son influence sur la migration des interneurons corticaux n'a, à notre connaissance, jamais été étudiée à ce jour. C'est à cette question que cherchent à répondre mes travaux de thèse.

La question de l'approche expérimentale est cruciale pour ce type de question biologique. En effet, comment séparer et étudier les contributions respectives des paramètres chimiques et physiques d'un environnement physiologique où tous ces signaux sont mélangés, et dépendent souvent les uns des autres ? La nécessité d'adopter une approche *in vitro* apparaît rapidement incontournable. Dans ce

contexte, les outils de microfabrication, développés par les physiciens et maintenant largement démocratisés chez les biologistes constituent des outils puissants pour construire des micro-environnements bio-compatibles dans lesquels les différents paramètres sont parfaitement contrôlés et modulables. Une partie importante de ma thèse a donc consisté à développer un nouveau système expérimental de substrats microstructurés combiné à la culture primaire d'interneurones embryonnaires pour y étudier leur migration. Les détails de cette mise au point sont présentés dans la partie de résultats complémentaires.

A l'issue de cette première phase de développement, nous avons sélectionné un relief de plots de tailles et espacements micrométriques pour la suite de l'étude. En effet, ce type de substrat nous a permis de mettre en évidence différentes morphologies et comportements dynamiques en faisant varier légèrement la forme des structures. Une série d'expériences et d'analyses morphologiques, structurales et dynamiques, nous a permis de décrire précisément ces différents comportements cellulaires. L'intérêt de cette étude est ainsi double : elle nous a permis de montrer pour la première fois l'existence d'un guidage par contact pour les interneurones corticaux, mais nous a également permis d'enrichir la caractérisation cellulaire de ces cellules et de leur migration, grâce à une approche réductionniste qui permet une visualisation détaillée des cellules et l'accès à leurs propriétés fondamentales. L'ensemble de ces résultats est regroupé dans un article scientifique présenté ci-après.

## II. Résultats



# Première partie

Control of cortical interneurons morphology and migration by  
topographical cues

Claire Leclech, Marianne Renner, Catherine Villard, Christine Métin



# Contrôle de la morphologie et la migration des interneurones corticaux par des indices topographiques

“Control of cortical interneurons morphology and migration by topographical cues”

Claire Leclech, Marianne Renner, Catherine Villard, Christine Métin

Article en preparation pour une soumission au journal “Biomaterials”

La question au centre de cette étude est celle de l’influence de la topographie du micro-environnement sur la migration des interneurones corticaux au cours du développement embryonnaire. En effet, le guidage de la longue migration de ces cellules n’a jusqu’alors été envisagé que d’un point de vue biochimique et moléculaire, en occultant le potentiel effet des paramètres physiques et mécaniques de l’environnement dans lequel naviguent ces cellules. L’importance de ces paramètres, et notamment de la topographie, sur la migration a été démontrée pour de nombreux types cellulaires ainsi que dans le cadre de la croissance axonale, mais reste de manière surprenante très peu explorée dans le contexte de la migration neuronale.

Pour répondre à cette question, nous avons opté pour une nouvelle approche expérimentale et avons développé des substrats microstructurés (fabriqués par photolithographie et moulages de PDMS) recouverts de molécules d’adhésion (N-cadhérine et laminine), sur lesquels des interneurones embryonnaires sont cultivés et leur migration analysée. Nous avons commencé par tester différentes géométries de structures micrométriques et nous nous sommes finalement concentrés sur un relief de micro-plots (10µm de taille et d’espacement) avec lesquels on obtient une migration soutenue et physiologique de cellules individuelles.

Nous avons observé un alignement remarquable des interneurones en migration entre les plots carrés, qui s’orientent selon deux directions préférentielles correspondant à la direction diagonale des carrés. De manière intéressante, cet alignement n’est pas visible sur une surface plane, mais est également perdue lorsque les plots carrés sont remplacés par des plots ronds, entre lesquels les cellules s’orientent aléatoirement. Nous avons ensuite analysé la morphologie générale des interneurones au niveau de la population sur des cultures fixées. Sur des substrats plats, différentes morphologies d’interneurones,

plus ou moins branchés sont observés. La proportion de ces morphologies est modifiée sur les substrats microstructurés, et la population enrichie en deux morphotypes opposés sur plots carrés et ronds : des interneurones longs et peu branchés sont majoritairement observés entre plots carrés, et à l'inverse des cellules courtes et branchées sont plus souvent présentes entre plots ronds. Une étude morphologique plus poussée nous a permis de préciser la caractérisation de ces deux morphotypes et d'en étoffer les critères : un prolongement de migration fin, un noyau allongé et un long prolongement arrière pour les longues cellules branchées, et à l'inverse un prolongement de migration large et un noyau arrondi pour les cellules courtes et branchées. L'observation de cellules alternant entre les deux morphotypes sur un substrat plat nous amène à penser que ces deux morphologies correspondent aux deux extrêmes du large spectre intrinsèque d'une seule population d'interneurones.

Nous avons ensuite analysé sur des séquences de mouvement de 6 à 7 heures le comportement migratoire global de ces deux morphotypes et démontré un lien fort entre morphologie cellulaire et dynamique de mouvement. En effet, les cellules branchées entre plots ronds montrent de nombreuses réorientations et un mouvement globalement peu directionnel. A l'inverse, les longues cellules non branchées présentent de longues phases directionnelles entre les plots carrés dans leur direction diagonale. Par ailleurs, nous avons mesuré des vitesses de migration réduites dans cet environnement.

Pour mieux comprendre la mise en place de ces différents états cellulaires, nous avons ensuite concentré notre analyse sur les différents compartiments subcellulaires des interneurones en migration : corps cellulaire, prolongement de migration et cône de croissance à l'avant. Nous avons visualisé le positionnement de ces différents compartiments entre les structures par microscopie électronique. Entre les plots carrés, nous avons observé un positionnement aléatoire du cône de croissance, reflet de son comportement exploratoire et dynamique. A l'inverse, le prolongement de migration en arrière s'étend entre les plots carrés dans leur direction diagonale en contactant alternativement et spécifiquement les coins des plots. Nous avons également observé que ce prolongement est formé de faisceaux de microtubules denses et stables (d'étyrosinés). Par une analyse dynamique du mouvement de la base du cône de croissance, nous avons pu montrer que l'orientation et la stabilité du prolongement de migration contraint l'avant de la cellule à un mouvement régulier et directionnel dans la direction diagonale entre les plots carrés. Le mouvement de la base du cône de croissance est quant à lui plus dynamique et erratique entre les plots ronds.

Pendant le déplacement des interneurones, le cône de croissance se divise régulièrement pour former des branches. Ce branchement dynamique permet une large exploration de l'environnement, et la stabilisation d'une branche dans laquelle transloque le noyau détermine la direction du mouvement. Dans nos cultures, nous avons pu distinguer deux modes de division du cône de croissance, et montrer

que la proportion de ces différents modes de division, ainsi que la fréquence de branchement était différente dans les deux types de topographie : les interneurones entre les plots carrés présentent des divisions peu fréquentes et majoritairement asymétriques (individualisation d'une fine branche latérale depuis le cône de croissance principal), tandis que les cônes de croissance des cellules entre plots ronds se divisent fréquemment et de manière symétrique (génération de deux branches équivalentes).

L'ensemble de ces résultats démontre la sensibilité des interneurones en migration à la topographie de leur environnement. Nous montrons que des indices topographiques de taille micrométrique génèrent des contraintes spatiales globales qui influencent la morphologie et le mouvement de ces cellules. En particulier, un changement de géométrie de l'environnement est capable d'orienter la cellule vers différents états cellulaires morphologiques et dynamiques observés *in vivo*. Ces résultats obtenus *in vitro* suggèrent que ce type d'indices pourrait également influencer le mouvement des interneurones *in vivo*, qui naviguent dans un environnement aux propriétés physiques qui varient dans le temps et l'espace.



# Control of cortical interneurons morphology and migration by topographical cues

Claire Leclech<sup>1,2,3,4</sup>, Marianne Renner, Catherine Villard<sup>2,4</sup>, Christine Métin<sup>1,2,3</sup>

1, INSERM, UMR-S839, Paris, France,

2, Sorbonne Universités, UPMC University Paris 6, UMR-S839, Paris, France,

3, Institut du Fer à Moulin, Paris, France

4, Laboratoire PhysicoChimie Curie, Institut Curie, CNRS, Université PSL, Paris, France.

## Abstract

Although contact guidance -the capacity of cells to orient, polarize and migrate along topographical features- is integral to many biological processes, it has largely been overlooked in the context of neuronal migration during brain development, mainly envisioned from a biochemical point of view. In the embryonic brain, cortical interneurons migrate long distances in a three-dimensional environment with a complex structure which might provide physical guidance cues to lead their movement. Using microstructured substrates, we therefore investigate the role of topography in cortical interneuron migration. By conducting a detailed morphological, structural and dynamic analysis, we find that different topographies of micron-sized pillars affect the orientation, morphology, cytoskeletal organization and dynamic behavior of these cells. In particular, most interneurons migrating in between square pillars adopt an elongated, unbranched morphology associated with a slow and directed movement, whereas the majority of cells among round pillars exhibited a short and branched morphology associated with a dynamic but wandering movement. Overall, we show that micron-sized topography provide global spatial constraints promoting the establishment of different morphological and migratory states *in vitro*, highlighting the potential importances of these types of cues *in vivo*.

## Introduction

Neuronal migration is a major phase of nervous system development whose alterations are often associated with brain disorders like microcephaly or lissencephaly<sup>1,2</sup>. Among the embryonic neurons, cortical interneurons travel over long distances in the developing brain, from the ventral ganglionic eminences where they are generated to the dorsally located cortex, where they play a crucial role in modulating the activity of cortical circuits in the adult<sup>3</sup>. Although individual interneurons show complex trajectories, their movement can be globally separated in two phases. Interneurons first reach the cortex by a directed migration in two main tangential streams. Next, they exit the streams through a radial reorientation which, associated with multidirectional movements, allows their dispersion throughout the cortical layers<sup>4-6</sup>. These different movements rely on elaborate and changing cell morphologies characterized by a dynamic branching of the leading process<sup>7-9</sup>.

The factors influencing interneuron migration have been extensively studied both *in vivo* and *in vitro*, mainly focusing on the cellular and intracellular responses to molecular guidance cues. In the current view, the expression of repulsive and motogenic factors in the ventral regions combined with the presence of attractive signals in the dorsal cortex play a central role in the guidance of these cells<sup>10-13</sup>. However, migrating interneurons are also exposed to various topographic and mechanical cues linked to the properties of their extracellular environment including various cellular substrates, e.g. neuronal progenitors, corticofugal axons or post-mitotic neurons<sup>4,14-16</sup>.

There are growing indications that physical parameters can have a crucial influence in the development of the nervous system<sup>17,18</sup>. It has been shown for example that the developing brain displays regional and temporal variations in stiffness which can affect axon pathfinding<sup>19-21</sup>. The topography of the environment has been also identified as a potent guidance cue for growing axons and for migrating cells in general, a process called contact guidance<sup>22,23</sup>. To dissect the role of such physical cues, various engineered topographical substrates, such as grooves<sup>24,25</sup>, pillars<sup>26,27</sup>, pits<sup>28,29</sup> or synthetic fibers<sup>30,31</sup>, were used to demonstrate *in vitro* the influence of topography on the migration of several cell types. A few studies employed micro-channels as a culture system for migrating cortical interneurons<sup>32,33</sup>, however none addressed the potential influence of topographical cues in the migration of these cells.

In this study, we investigated this question using microstructured substrates and demonstrated the high sensitivity of cortical interneurons to the architecture of their environment. Our results revealed that topographical constraints efficiently modulate interneuron orientation, morphology, cytoskeletal organization, branching dynamics and migratory behavior. In particular, by using two shapes of micron-sized pillars, we have been able to select and stabilize *in vitro* two main migratory behaviors observed

*in vivo*, associated with specific morphologies: long, unbranched cells with a directional movement among square pillars, and short, branched cells displaying a fast, exploratory migration among round pillars. This study therefore provides new insights in the guidance and the biology of these cells by enlightening the link between their morphology and their mode of migration. The *in vitro* model proposed in this study thus emerges as a new promising tool to control and study interneuron migratory behaviors in physiological or pathological conditions.

## Results

### Design of microstructured substrates to study the migration of interneurons

To test the role of topographical cues on cortical interneuron migration, we developed microstructured substrates of various topographies using photolithography and polydimethylsiloxane (PDMS) molding. The final culture coverslip is composed of a thin layer of microstructured PDMS strongly attached on a glass coverslip (Fig.1A). This original last step of fabrication allows high workability for cell culture because the glass/PDMS coverslips can be manipulated as regular glass coverslips. The 10 $\mu$ m high PDMS micron-sized structures provide a pseudo-3D open environment easily supplied with oxygen and culture medium. Fluorescent live or fixed cells can be imaged with high magnification through the thin layer of PDMS, and immunostaining is easily performed. Before culture, the microstructured substrates were functionalized with a homogeneous coating of laminin and N-cadherin, two adhesion molecules promoting both interneuron polarization and migration<sup>34,35</sup>. Medial ganglionic eminences (MGE) explants, the main region of origin of cortical interneurons, dissected from mouse brain embryos released polarized and radially-oriented interneurons that colonize the surrounding substrate for approximately 24 hours (Fig.1B). Whatever the topographies, the height of the structures constrained cell adhesion and migration at the bottom of the microstructured surfaces. The space in between structures therefore defined the path available for cell migration.

We designed and tested different geometries of topography inspired from the literature, using flat PDMS surfaces as a control (Fig.1C and Fig.S1A). Grooves have been widely employed to promote the migration and guidance of several cell types<sup>22,36</sup>. We therefore first designed and tested a topography of grooves (6 $\mu$ m wide, 10 $\mu$ m high) radiating from the explant and intersected every 200 $\mu$ m by concentric circular grooves, allowing possible reorientations as observed *in vivo* (Fig.1D and Fig.S1B). On this pattern, interneurons most often appeared as long bipolar cells migrating in chain on the bottom of the grooves. A few isolated cells were observed at the front of migration (Fig. S1B). Some interneurons turned at intersections but their leading process remained non-branched, a morphology rarely observed *in vivo*. We concluded that the spatial constraints created by grooves were too high and

the proposed turning angle too abrupt, preventing the formation and extension of branched processes. In a second design, we therefore decided to increase the width and overall surface of migration paths and to offer milder turning angles. This was achieved by implementing an array of hexagons (68 $\mu$ m long, 10 $\mu$ m high) providing 10 $\mu$ m wide intersecting paths forming 100-degree open angles (Fig.1E and Fig.S1C). We observed that the leading processes of interneurons now branched at bifurcations. However, similarly to what was observed on flat surfaces, cell bodies often aggregated at the front of migration, preventing a correct visualization of individual cells (Fig.1C,E).

We hypothesized that such aggregation phenomena may arise from a still too restricted migration surface, resulting in high cell densities in between the structures. We therefore turned to smaller topographies made of regularly spaced micro-pillars, square or round, of 10 $\mu$ m in width/diameter and height, separated by 10 $\mu$ m (Fig. 1F,G). In these environments, interneurons leaving MGE explants migrated in between pillars with physiological branched morphologies (Fig.1SD) and no longer aggregated. Rather, cells remained individualized at the front of migration. Accordingly, the mean distance between neighboring cell bodies at the front of migration on pillars was significantly increased as compared with cultures performed on a flat substrate (Fig.1H). In addition, the distance of migration from the explant after 24 hours was also significantly higher in both types of pillars as compared with flat surfaces (440  $\pm$  18 $\mu$ m and 493  $\pm$  21 $\mu$ m in square and round pillars respectively vs 333  $\pm$  16 $\mu$ m on flat, Fig.1I).

In conclusion, the use of regular arrays of micropillars improved the overall migration of interneurons, promoting physiological migration of individual cells over long distances. We therefore used these pillared substrates to perform an in-depth analysis of the influence of the topography on the migratory behavior of embryonic interneurons.

### **Microtopography influences interneurons orientation and morphology**

Migrating interneurons cultures from MGE explants showed various macroscopic organization. Interestingly, interneurons released on square pillars frequently formed a mesh of long and perpendicularly oriented cells (type 1-2, 45% of the coverslips, Fig.S2) but this organization was almost never observed on round pillars. On these surfaces, the majority of explants released short and more randomly oriented cells (type 3-4, 97% of the coverslips, Fig.S2).

We therefore analyzed surfaces the direction of the main leading process of interneurons located at the front of migration on fixed cultures (Fig.2A). Note that pillared substrates display four lines of symmetry (i.e. horizontal, vertical and diagonals). In cultures performed on a flat PDMS surface, random orientation of interneurons was observed. In contrast, interneurons in between round pillars oriented equally along the four directions corresponding to the aforementioned lines of symmetry (Fig. 2B). Very

remarkably, when round pillars were replaced by square pillars, the orientation of interneurons was almost exclusively restricted to the two diagonals (Fig.2B, with 80% of the cells at the front of migration oriented in the {30-60°} and {120-150°} ranges). The topography of the substrate has therefore a major impact on the orientation of the leading process of interneurons.

We next examined the morphology of migrating interneurons. On flat surfaces, we observed a wide range of morphologies, with more or less branched leading processes (Fig.2C). This diversity appeared to be strongly reduced on pillared surfaces. Strikingly, unbranched interneurons were dominant on square pillars whereas branched cells were predominantly found on round pillars (Fig.2C). Accordingly, quantifications of the number of bifurcations showed that the proportion of cells with a unique non-bifurcated leading process was higher on square pillars ( $79\% \pm 2.8$ ) than on flat surface and round pillars ( $59.7\% \pm 3.35$  and  $45\% \pm 4.86$  respectively, Fig.2D). Conversely, the proportion of branched interneurons showing at least 2 bifurcations of their leading process was significantly increased on round pillars ( $8\% \pm 0.5$  on square vs  $35\% \pm 6$  on round pillars, Fig.2D). On flat surfaces, the proportion of these different morphologies was intermediate (Fig.2D). Interestingly, the leading processes of interneurons cultured on square pillars were in addition significantly longer on average ( $49.6 \pm 1.5 \mu\text{m}$ ) than those of interneurons cultured on either flat surfaces or round pillars ( $34.2 \pm 1.7 \mu\text{m}$  and  $33.7 \pm 3.3 \mu\text{m}$ , respectively, Fig 2E).

To confirm this association of morphological features, we conducted a detailed analysis on a selected pool of interneurons showing the two main morphologies observed: long and unbranched within square pillars versus short and branched within round pillars. We confirmed that interneurons with long leading processes often presented few lateral branches, but also a thin leading process, an elongated nucleus and a long trailing process (Fig.S3B-H). In contrast, interneurons with short leading processes are associated with numerous branches, a wide main leading process, a round nucleus and a short trailing process (Fig.S3B-H).

In conclusion, it therefore appeared that opposite morphologies of interneurons are segregated on the two types of topographies: long and non-branched along the diagonals defined by square pillars, short and branched oriented along the four main directions of the round pillars array (Fig.S3B,C). The presence of intermediate morphologies on flat surface, and the observation that a single cell can successively adopt these two morphologies during its migration (Fig.S3A) suggests that these two morphological states (or morphotypes) likely represent the extremities of a large morphological spectrum exhibited by a unique population of migrating interneurons.

### Microtopography influences interneurons dynamic behaviors

We then analyzed the global migratory behavior of interneurons by phase contrast video-microscopy on sequences of 6-7 hours of movement by following individual cells at the front of migration and analyzing cell directionality and motility parameters. Typical behaviors observed on flat and both pillared surfaces are displayed in Fig. 3 A-C, representing cell bodies trajectories color coded with the instantaneous speed, and Fig. 3D-F showing short temporal sequences of interneuron movements.

We observed that interneurons alternated between directional phases (when the cell body moved forward in a non-branched leading process, Fig. 3D) and phases of reorientations (associated with branching of the leading process and somal translocation in a divergent branch, Fig. 3E-F, orange arrows). Changes in direction could also arise from polarity reversal between leading and trailing processes (Fig.3E, blue arrows). Interneurons in between round pillars, which are mainly branched, showed accordingly an increased frequency of reorientations along their trajectories compared to square pillars or flat surfaces ( $0.39$  reorientations/h  $\pm$   $0.02$  vs  $0.25 \pm 0.01$  on flat and  $0.19 \pm 0.01$  on square, Fig.3G). Interestingly, the frequency of polarity reversals was very low on both microstructured substrates compared to flat surfaces ( $0.16 \pm 0.01$  and  $0.15 \pm 0.01$  reversals/h in square and round respectively vs  $0.3 \pm 0.01$  on flat, Fig.3H, movie2).

Because of this high frequency of reorientations, cell bodies of interneurons showed erratic trajectories with very short directional phases in between round pillars (Fig. 3C, movie3). In contrast, cells bodies in between square pillars presented long directional phases along the diagonal direction, interrupted by few turns (often at  $90^\circ$ ) (Fig.3A, movie1). Accordingly, the persistence of direction (measured by the directionality ratio, between the effective and the shortest trajectory of the soma) is higher in square pillars ( $0.59 \pm 0.01$ ) compared to round pillars ( $0.52 \pm 0.01$ ) or flat surfaces ( $0.53 \pm 0.01$ , Fig.3I). In this last condition, the decreased persistence of direction was likely due to the increased frequency of polarity reversals.

Finally, we analyzed cell motility and found that the mean migration speed of cells among square pillars and on flat surfaces did not significantly differ ( $60.68 \pm 1.98$   $\mu\text{m}/\text{h}$  on square,  $58.9 \pm 1.6$   $\mu\text{m}/\text{h}$  on flat), whereas cells migrating among round pillars moved significantly faster ( $68.4 \pm 1.54$   $\mu\text{m}/\text{h}$ , Fig.3J).

Overall, the two morphotypes present in the microstructured environments therefore display two different migratory behaviors: slow and directional in between square pillars, faster but less directional among round pillars. These results highlight a strong link between morphological and dynamic parameters. To further decipher these different cellular behaviors, we performed an in-depth structural and dynamic investigation at the level of the three main sub-cellular compartments of migrating

interneurons: soma, leading process and growth cone with a focus on the modalities of their interaction with the microtopography.

### **Interneurons positioning within pillared surfaces**

To better visualize the positioning of interneurons with respect to the microtopography, we examined cultures performed on either square or round pillars using scanning electron microscopy (SEM). This structural analysis was completed by immunolabelling to gain insight into the intracellular organization of these cells (Fig. 4).

We first investigated the interactions of the cell body with the microtopography. SEM observations and immunostaining of the nucleus confirmed that long cells migrating among square pillars had elongated cell bodies, contrasting with the spherical cell bodies of the branched cells migrating among round pillars (Fig.4A-D). We moreover noticed that the elongated soma of cells migrating along the diagonal in between square pillars often touched two pillars simultaneously, one on each side of the cell body (Fig.4A,C,E yellow arrows). By contrast, soma on round pillars predominantly engaged with a single pillar at a time (Fig.4B,D,E, yellow arrows). We confirmed this observation by measuring the time of contacts with the pillars in time-lapse experiments: simultaneous contacts with two pillars are more frequent in square pillars ( $32.3\% \pm 2.8$  of the trajectory, Fig.4F, movie4) than in round pillars ( $16.2\% \pm 2.1$  of the trajectory, Fig.4F, movie5).

Growth cones, the protrusive and exploratory structures at the extremity of leading processes, showed very complex and diverse shapes in both types of topographies. They often positioned along the vertical side of pillars (although never reaching their tops) and could largely enwrap them regardless of their round or square shapes. The contact points of growth cones were regularly distributed all around the round and square pillars, suggesting a wide and random exploratory behavior of the growth cones (Fig.4G,I,H,K, blue dots).

In contrast, the leading process behind in square pillars stereotypically extended from corner to corner, as shown by the restricted contacts of the leading process with the corners of the structures (Fig.4G,J, red dots). In front of corners, processes presented small enlargements suggestive of specific interaction with the structures in this region. On the contrary, leading processes extending at the basis of round pillars contacted the pillars on all its circumference (Fig. 4,H,L).

As the main differences between the modalities of interaction with microstructures were found at the leading process and soma levels, we next examined the structural organization of these two compartments and in particular the organization of the microtubules network and tubulin post-translational modifications.

We performed immunostaining of dynamic microtubules with antibodies against tyrosinated tubulin and of stable microtubules with antibodies against detyrosinated tubulin (Fig4 M,N). Interneurons migrating among square pillars presented leading processes enriched in long and tight bundles of stable microtubules (Fig. 4M) whereas interneurons migrating on round pillars showed wide leading processes enriched in dynamic microtubules organized in short and spread structures (Fig.4N). Interneurons migrating on both topographies thus differed by the relative abundance of stable and dynamic microtubules in their leading process. Interestingly, the organization of the microtubule networks at the level of the cell body of cells between square or round pillars also differed. In both cases, we observed a network of looped stable (detyrosinated) microtubules around the nucleus (Fig4M,N and Fig.S4A,B). This looped organization was further confirmed and detailed using SIM super resolution microscopy on flat glass surface (Fig.S4C). Around the elongated nucleus in between square pillars, we could observe an alignment of the dynamic (tyrosinated) microtubules along the main axis of the cell (Fig.4M and Fig.S4A, yellow arrows). In particular, part of this dynamic network organized in a rail positioned below the nucleus in contact with the substrate, and in continuity with the microtubules bundles extending from the leading to the trailing process (Fig.4M, yellow arrows). Such an organization was never observed in short, branched cells (Fig.4N and Fig.S4B).

The extension of a stable leading process with a specific and restricted pattern of interaction with the corners of the pillars therefore appeared to be at the basis of the particular orientation and alignment observed in the diagonal direction of square pillars. To further understand the establishment of this orientation, we next examined the dynamic navigation of the leading cell tip in between the micro structures.

### **Cell tip navigation in between pillars**

Cell tip movement and navigation among the structures were analyzed on sequences of 2-3 hours of movement on MGE cells recorded by phase contrast video-microscopy. Because of complex and fast transformations of the growth cone in migrating interneurons incompatible with the resolution of recordings, our analysis of the cell tip is based on the tracking of the base of the growth cone corresponding to the leading process tip (LPT) (red dots on Fig.5 and movies 6,7).

LPT recordings and tracking showed that despite occasional 90° turns, LPT of interneurons migrating among square pillars exhibit straight trajectories and maintained the same direction of movement over several hours (Fig.5A). Accordingly, the persistence of direction measured by the directionality ratio is significantly higher on square pillars ( $0.80 \pm 0.01$ ) than on flat surfaces ( $0.64 \pm 0.02$ , Fig. 5D). LPT movements among square pillars were often confined to the diagonal direction where it progressed from a corner to the next in a regular manner (Fig. 5E,G, movie6). Accordingly, the distance between a

LPT and the closest pillar on its diagonal trajectory never exceeded  $4 \mu\text{m}$  (mean amplitude  $2.23 \mu\text{m} \pm 0.09$ , Fig.5I,K). Surprisingly, this limited range of exploration did not reflect the variety of growth cones positions observed by SEM around square pillars (Fig.4G,I). Rather, LPT trajectories prolonged the leading process orientation and we therefore conclude that LPT movements were highly constrained by the leading process behind.

On the contrary, LPT navigating among round pillars explored the space between pillars in an apparent random way with frequent turns, as attested by their lower persistence of migration (Fig5C, directionality ratio:  $0.69 \pm 0.02$ , fig.5D, movie7). The distances between LPT and the closest pillar varied more largely than among square pillars ( $0\text{-}8 \mu\text{m}$ , Fig 5H,J, mean amplitude:  $3.076 \mu\text{m} \pm 0.12$ , Fig.5K). In addition, LPT migrated faster among round pillars than among square pillars (Fig.5L,  $96.36 \mu\text{m}/\text{h} \pm 4$  vs  $83.30 \mu\text{m} \pm 3.47$  in square pillars). The leading tips of interneurons migrating among round pillars was thus more motile and less directed than those of interneurons migrating among square pillars.

Overall, the dynamics of the leading tip appeared similar to the dynamics of the cell body in the same conditions. In addition, the cell tip of interneurons migrating among square pillars displayed directional movements that seemed strongly constrained by the orientation and stability of the leading process behind.

### **Microtopography influences interneurons branching dynamics**

As previously described, cortical interneurons on our PDMS substrates regularly formed branches at the cell front by splitting of their growth cones. The production of new branches by growth cone neof ormation along the main shaft of the leading process, which has been observed in organotypic slices or in co-cultures<sup>37,38</sup>, was not observed in our culture conditions.

We examined branching dynamics on time-lapse sequences of 2-3 hours of movement. A careful examination of leading growth cone divisions revealed two main modes of splitting, either symmetrical that produced sister branches with similar activities (Fig.6A, pink arrows, movie8) or asymmetrical that gave rise to a large growth cone and a much thinner and transient lateral branch (Fig. 6B, movie9). While these two splitting modes were present in similar proportions on flat surfaces (symmetric:  $47.7\% \pm 4.7$ , asymmetric:  $40.7\% \pm 4.5$ , Fig.6C), symmetric splitting was dominant in round pillars (symmetric:  $56.1\% \pm 3.9$ , asymmetric:  $26.7\% \pm 4.2$ ). On the contrary, asymmetric splitting was preferentially observed on square pillars (symmetric:  $30.6\% \pm 6.1$ , asymmetric:  $51.1\% \pm 6.1$ ). Overall we measured that growth cone splitting in square pillars was twice less frequent than on flat surface and round pillars ( $1.42$  bifurcation/h  $\pm 0.23$  in square,  $2.44 \pm 0.30$  on flat,  $2.77 \pm 0.30$  in round, Fig6D).

We moreover noticed that asymmetric divisions often associated with a compact morphology of the growth cone. Accordingly, tyrosinated microtubules invading the growth cone of interneurons migrating among square pillars spread less largely than those in the tip of interneurons migrating among round pillars (Fig 6E).

In conclusion, different frequency and mode of branch formation were observed among the two types of micro-pillars, supporting the establishment of differently branched morphologies at the population level.

## Discussion

Microstructured substrates characterized by arrays of micron-sized pillars selected two morphological states of embryonic cortical interneurons, revealing the existence of contact guidance phenomena for these cells. Remarkably, interneuron released from embryonic explants on pillared surfaces replicate two major phases of *in vivo* migration: the directed movement observed in the tangential streams of migration (square pillars), and the dissemination phase within the cortical plate (round pillars). Our approach therefore provides the usual advantages of *in vitro* platforms, such as accessibility, fine tuning of cell culture parameters and a precise quantification of various aspects of cell behaviors, but also allows the specific application of these tools to interneurons in different migratory stages.

On square pillared arrays, interneurons tend to extend a long and thin leading process containing bundled and stable (detyrosinated) microtubules. This organization was associated with a decreased branching frequency and asymmetrical splitting of the growth cone leading to a globally unipolar leading process. This is consistent with the link reported between microtubules stabilization and branching in interneurons lacking Doublecortin (DCX), a protein associated with microtubules stabilization<sup>38</sup>. The maintenance of a unique leading process and a clear directional axis promoted directional movement along the diagonal direction of square pillars. In contrast, round pillar arrays promoted frequent symmetric splitting of the growth cone leading to many reorientation events and erratic trajectories. In addition, interneurons on these pillared surfaces often presented a short, wide and branched leading process with mildly bundled, dynamic microtubules associated with a round nucleus. Interestingly, microtubules detyrosination seemed to appear gradually from the periphery when the leading process length increased, suggesting that the stabilization of microtubules might be linked to the lengthening and thinning of the leading process.

The microtopographies therefore stabilized two different cellular states which likely represent two extremities of a wide intrinsic morphological and dynamic repertoire a unique population of interneuron

can adopt. This raises the question of the selection of these morphotypes by the different topographies. The observation that long leading processes extending in the diagonal direction of square pillars engage restricted physical contacts with the corners, in contrast with their ability to enfold round pillars, suggests that curvature might be a key parameter. The localized high curvature at the corners of square pillars may prevent bending of the leading process, thus stabilizing its orientation and trajectory once engaged into a diagonal path. How regular and discrete contact points with the structures would in turn stabilize a long, stable and unbranched leading process remains however an open question. The development of a mechanical tension in the leading process between the enlarged adhesive areas observed at corners, in line with the elongated soma shape, is an hypothesis that would deserve further investigations. Interestingly, it has been shown that applying tension on growing axons by attachment to carbon nanotubes suppress branching <sup>39</sup>, similarly to what we observed in between square pillars. Besides the interaction with individual microstructures, the global architecture of the pillar arrays must also be considered. In particular, we observed that surfaces patterned with square pillars induced physical constraints on soma, which likely influenced its movement and motility. These constraints were mostly relieved within arrays of round pillar arrays due to their reduced surface, providing thus an increase of free surface allowed for migration. This may facilitate the growth cone random exploration of the environment and increased branching that we observed in this environment, favoring multipolar cell morphologies and directional changes.

*In vivo*, interneurons alternate between globally directed movement (in the tangential streams of migration), and reorientations (towards the cortical plate in the cortex). More generally, these different phases of movement can be seen as two different migration strategies: one directed and the other more exploratory, both serving different purposes along the course of interneuron displacement. While directed migration maintains interneurons in streams, it has been suggested that a random, exploratory strategy of movement in the marginal zone participates in interneuron dispersion in the developing cortex (Tanaka et al., 2009). The signals controlling the switch between these two types of migration remain partly elucidated. Our study reveals that a simple change in the geometry of the topography can orient interneurons towards one strategy of movement or the other *in vitro*. *In vivo*, embryonic interneurons are exposed to various cytoarchitectural arrangements, particularly in the cortex as highlighted by the spatially and temporally changing mechanical properties of the different cortical layers (Iwashita et al., 2014). In light of our results, we can therefore hypothesize that the architecture of the environment can influence interneuron migration *in vivo* and contribute to the selection of migratory behavior in the cortex.

Overall, this study provides new findings stressing the importance of biophysical extracellular signals in brain development. The resulting repercussions might be multiple, in physiological but also pathological

contexts where it can provide new insights in the etiology of neurodevelopmental syndromes involving defects in neuronal migration.

## Methods

### Animals

E12.5 pregnant Swiss mouse were purchased from Janvier Labs. Experiments and animal care followed the European guidelines and were approved by the Ethical Committee Charles Darwin N°5 (E2CD5).

### Microfabrication

The original master mold was fabricated by photolithography as follows. A 10µm-thick layer of SU8-2010 (MicroChem) was formed on a 2-inch silicon wafer (Neyco) by spincoating at 3000 rpm for 30 s. After a soft bake (1 min at 65°C and 2 min at 95°C), the wafer was exposed to UV light (MJB4 Mask Aligner, SUSS MicroTec, 23mW/cm<sup>2</sup> power lamp) through a hard chromium mask prior to a post exposure bake (1 min at 65°C and 3 min at 95°C) and developed 2.5 min under agitation using SU-8 developer (MicroChem). After oxygen plasma treatment of 30 sec, the obtained mold was exposed to a vapor of (Tridecafluoro-1,1,2,2 tetrahydrooctyl)trichlorosilane (AB111444, ABCR GmbH & Co. KG) for 20 minutes once, and used repeatedly without further treatment. The same procedure was applied once on every PDMS replica subsequently fabricated before another round of molding.

Polydimethylsiloxane (PDMS; Sylgard) was mixed with its linker (ratio 1:10), poured onto the original master mold, degassed under vacuum and reticulated overnight at 70°C. Another round of PDMS molding and demolding was performed under the same conditions to get a final master mold with a negative topography. To create the final culture coverslip, PDMS was mixed with its linker, directly poured on the mold and spin coated at 3000 rpm for 30 seconds (for a final theoretical thickness of 30µm). Before reticulation overnight at 70°C, a glass coverslip was gently placed on top of the PDMS layer (see Fig.1A). After reticulation, the glass coverslip attached to the microstructured PDMS layer was gently demolded with a scalpel and isopropanol to facilitate detachment. Microstructured coverslips were then sonicated for 10 minutes in ethanol for cleaning and rinsed in water.

### MGE explant cultures

Microstructured cultures coverslips were fixed with silicon at the bottom of perforated petri dishes which were used as a culture chamber for the video microscopy experiments. Otherwise, coverslips were placed in 4-well boxes.

### *Coating*

N-Cadherin and laminin coating was performed according to the protocol detailed in Leclech & Métin 2018. Briefly, microstructured coverslips were first incubated for 9 hours at 37°C with 200µg/mL of poly-L-lysine (MW 538 000, Sigma). After 3 washes with water and drying for 15 minutes, coverslips were incubated overnight at 4°C with 4µg/mL laminin (from mouse sarcoma, Sigma) and 4µg/mL goat anti-human Fc antibody (Sigma) in borate buffer. Coverslips were then incubated with 0.25mg/cm<sup>2</sup> purified N-Cadherin-hFc chimera protein (R&D system) for 2h at 37°C. After one wash with borate buffer, the coverslips were incubated at room temperature with a saturation buffer composed of 1.5% Bovine Serum Albumin (BSA) in borate buffer for 10 minutes and directly replaced by culture medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12, Gibco) supplemented with, GlutaMAX supplement (Gibco), HEPES buffer 10mM (Gibco), glucose 30%, penicillin/streptomycin, N2 and B27 supplement.

### *MGE explant cultures*

Medial ganglionic eminences (MGE) were extracted from the brain of E12.5 wild type embryos, and cut in 6-8 pieces of equal size (each one containing a part of the ventricular zone) as explained in Leclech & Métin 2018. All the explants from one MGE were put to adhere on the surface of a microstructured coverslip at the bottom of the culture dish. After 6-8 hours of culture at 37°C, the first interneurons start to migrate out of the explant.

### **Time lapse recording**

Time-lapse recording started after 6-8 hours of cultures, when the first migrating interneurons were seen exiting the explants. Before time-lapse recording, medium was replaced by a culture medium without phenol red, with sodium pyruvate 100mM (Gibco) and with an increased concentration of Hepes buffer (20 mM instead of 10 mM). Cultures were imaged in phase contrast on an inverted video-microscope (Leica DMIRE2) equipped with a Cool snap Myo camera (Photometrics). Cells were recorded using an 20X objective, every 115 seconds, for 12h. Acquisitions were controlled using Metamorph software (Roper Scientific, Trenton, NJ, USA).

### **Immunostainings**

For immunostainings, cultures were fixed after 24h of culture in warmed 4% paraformaldehyde (PFA), 1% sucrose in 0.12M phosphate buffer for 5h. After 3 washes in Phosphate-Buffered Saline 1X (PBS), coverslips were gently detached from the culture dish and put in a humid chamber. Cells were incubated for 1h with a blocking solution containing 0.25% Triton, 10% normal horse serum (HS), 2% bovine serum albumin (BSA) in phosphate buffer saline (PBS). Cells were then incubated overnight at 4°C with primary

antibodies diluted a solution containing 0.25% Triton, 2% HS, 1% BSA. The following primary antibodies were used: rat anti-tyrosinated tubulin (YL 1/2 ab6160 Abcam) 1:2000, rabbit anti-detyrosinated tubulin (L15) 1:1000. Appropriate Alexa Fluor dye-conjugated secondary antibody (Invitrogen) diluted 1:1000 in PBS Triton 0.25% and incubated 1h30 at room temperature was used to detect primary antibodies. Bisbenzimidazole incubation (1:5000 in PBS Triton 0.25%, 5 minutes at room temperature) was used for fluorescent nuclear counterstaining. Cultures were mounted in Mowiol-Dabco and observed using an upright fluorescent microscope (DM6000; Leica).

### Scanning electron microscopy

Cultures were fixed in 2% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer pH 7.4. They were dehydrated in a graded series of ethanol solutions, then dried by the CO<sub>2</sub> critical-point method using EM CPD300 (Leica microsystems). Samples were mounted on an aluminum stub with a silver lacquer and sputtercoated with a 5nm platinum layer using EM ACE600 (Leica microsystems). Acquisitions were performed using a GeminiSEM 500 (Zeiss).

### Structured-illumination microscopy (SIM)

For SIM, fixed cultures of migrating interneurons on glass coverslips coated with n-cadherin and laminin were used, and immunostainings were performed as described before. Super-resolution structured-illumination microscopy was performed on a Zeiss Elyra PS.1 system equipped with a 63x (N.A. 1.4), 100x (N.A. 1.46) objectives and an EMCCD Andor, iXon 885 camera.

### Data analysis

#### *Analyses of fixed cultures of MGE cells*

All images for quantifications on fixed cultures were acquired on an upright epifluorescent microscope (DM6000; Leica) with the following objectives: 20x (NA = 0.7), 63x and 100x linked with a CoolSNAP EZ CCD camera (Photometrics) controlled by Metamorph software (Molecular Devices).

Quantifications of the distances of migration were done on mosaic pictures of whole explants acquired with a 20x objective. For each explant, 4 measures of distances from the explant to the front of migration were performed and averaged.

The rest of the quantifications were performed on pictures acquired with a X20 objective at the front of migration (in average the 200 $\mu$ m wide outermost ring around the explant). Different fields from various explants of at least 3 independent experiments were selected.

**Internuclear distance:** the coordinates of the cell bodies positions were extracted using ImageJ software. Subsequently, a custom-written MATLAB script was used to calculate the distances between cell bodies

and display for each cell the distance to its five closest neighbors (representative of the number of cells in close vicinity).

**Cell orientation:** the images were first rotated to have the same orientation of the pillars. Leading processes were manually traced and their orientations (expressed as angles) calculated using ImageJ. For unipolar cells, cell orientation was assimilated as the orientation the main leading process. For branched cells, the main leading process was defined as the active process (capped by the growth cone and usually longest and thickest process as well), or the process before the bifurcation in case of total symmetry between two branches. Negative angles were converted to their symmetric positive counterpart to work in a half circle of 0-180° angles. Rose histograms were generated in MATLAB.

**Morphological analysis:** analysis at the population level were manually performed on individual cells with the help of the NeuronJ plugin on ImageJ. Measures of leading process length were also performed manually with ImageJ, using the same criteria described for cell orientation.

#### *Analyses of recorded MGE cells*

Quantifications of growth cone movement and branching were performed on the same selection of cells from at least 3 independent experiments. Interneurons migrating forward with minimal contacts with other cells were analyzed: interneurons not moving during the time of the analysis (2-3 hours) were excluded.

**Leading process tip (LPT) movement:** LPT was manually tracked on 2-3 hours sequences of movement using the MTrackJ plugin on Image J. For unipolar cells, the LPT correspond to the base of the unique growth cone. For branched cells, the LPT was retroactively tracked as the base of the main growth cone capping the stabilized and selected branch. The directionality ratio (ratio between the distance from the first to the last point of the trajectory and the length of the actual cell trajectory) was calculated using the Excel Macro in Gorelik 2014. The quantification of LPT movement with respect to the pillars was performed using a custom-written MATLAB script. More precisely, a mask of the structures shape is extracted from the phase contrast movie, allowing to calculate the coordinates of the position of each pillar. For each LPT position, the distances to the different pillars are calculated and the shortest distance is selected to affect the position to a pillar. The program displays a list of all the distances LPT-pillar, as well as a graphical representation of the successive positions of the LPT in between the structures color coded with the distance to the closest pillar explored.

**Branching dynamics:** the appearance, duration and nature of bifurcation events was noted. From these data, the branching frequency (number of splitting events/hour) as well as the proportions of the different splitting modes (number of events of a mode/total number of splitting events) was calculated and averaged amongst the cells.

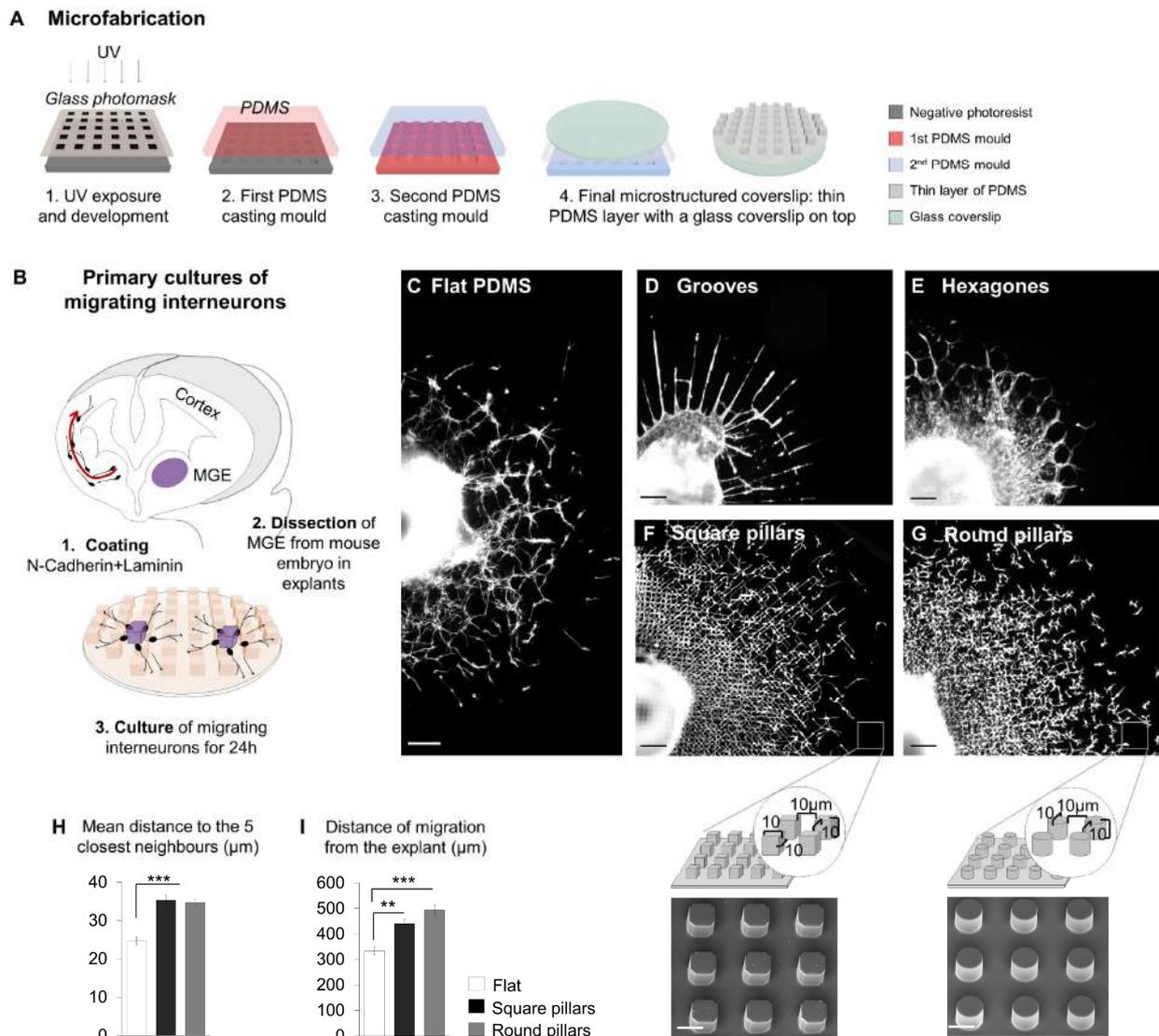
**Interaction of the cell body with the structures:** for each frame of a sequence of movement, the number of pillars touched (0, 1 or 2) was noted, and the percentage of these different configurations was calculated along each trajectory.

**Whole cell dynamics:** the cell body of individual cells (selected with the same criteria described before) was tracked from different explants of at least 3 independent experiments for in average 6-8 hours. Cell tracking was performed manually using the MTrackJ plugin on image J. From the coordinates of each position and the instantaneous speed generated by MTrackJ, trajectories color coded with the speed were created using a homemade MatLab program. The number of reorientations and polarity reversals were counted manually and their frequency calculated for each cell. The directionality ratio was calculated using the Excel Macro in Gorelik 2014.

### Statistics

In text and figures, the variability around mean values is represented by s.e.m. (standard error of mean). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. Student's t-test was used to compare null hypotheses between two groups for normally distributed data. Multiple groups were compared by ANOVA, followed by the Tukey posthoc analysis, or the non-parametric Kruskal–Wallis test with Dunn's post hoc testing, as dictated by the size and distribution of the data. Statistical differences between the frequencies of several parameters in distinct experimental conditions were assessed by a Chi2 test. Significance for individual values in distributions was assessed by the Fisher test. Number of data points for each experiment, the specific statistical tests and significance levels are noted in the figure text.

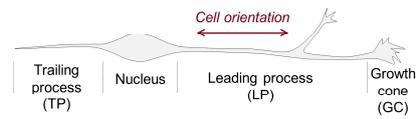
## Figures and legends



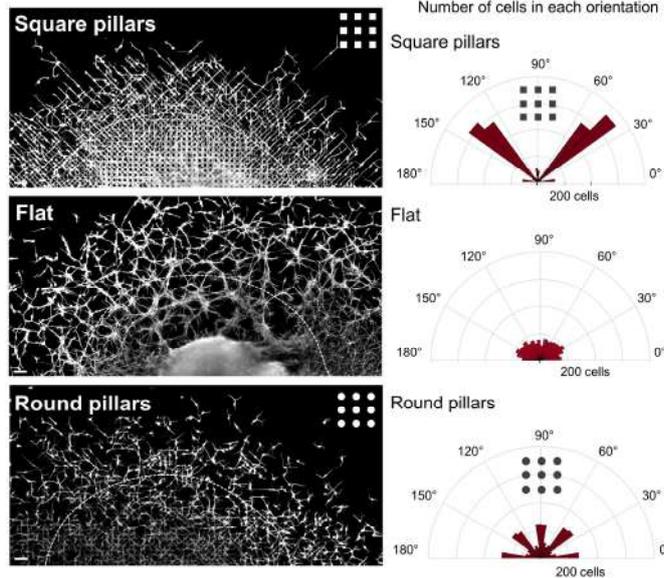
**Figure 1: *In vitro* migration of interneurons on microstructured substrates**

(A) Schematics of the microfabrication steps used to create the microstructured coverslips. (B) Different steps of the primary cultures of migrating interneurons from the MGE. (C-E) Interneurons migrating on flat PDMS (C), in  $6\mu\text{m}$  wide grooves (D) in between hexagones (E) after 24h. Tyrosinated tubulin staining. Scale  $100\mu\text{m}$ . (F,G) Interneurons migrating in between square pillars (F) and round pillars (G) with schematics and scanning electron microscopy images of the microstructures. Scale  $10\mu\text{m}$ . (H) Mean distance of each cell to its 5 closest neighbors at the front of migration. Flat:  $n=10$  explants (4 cultures). Square pillars  $n=10$  explants (3 cultures), round pillars  $n=10$  explants (3 cultures). Error bars represent mean  $\pm$  SEM. One-way ANOVA, Tukey's post test ( $p<0.0001$ ). (I) Distance of migration from the explant on fixed cultures after 24h (mean of 4 measures/explant). Flat  $n=49$  explants (4 cultures), Square pillars  $n=98$  explants (7 cultures), round pillars  $n=62$  explants (6 cultures). Error bars represent mean  $\pm$  SEM. Non-parametric ANOVA, Dunn's post test ( $p<0.0001$ ).

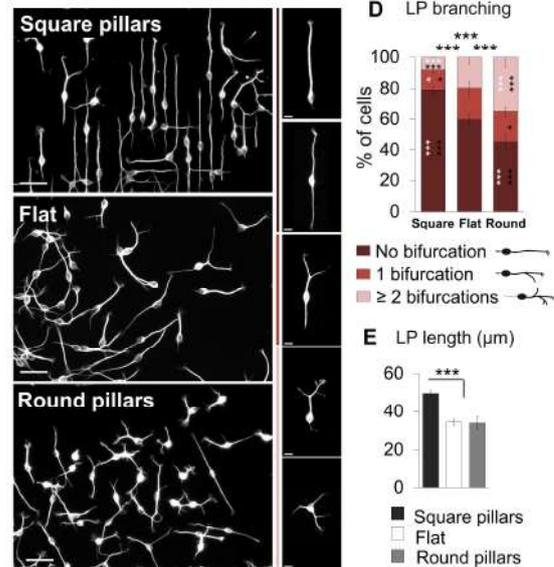
**A Interneurons morphology and sub-cellular compartments**



**B Interneuron orientation**

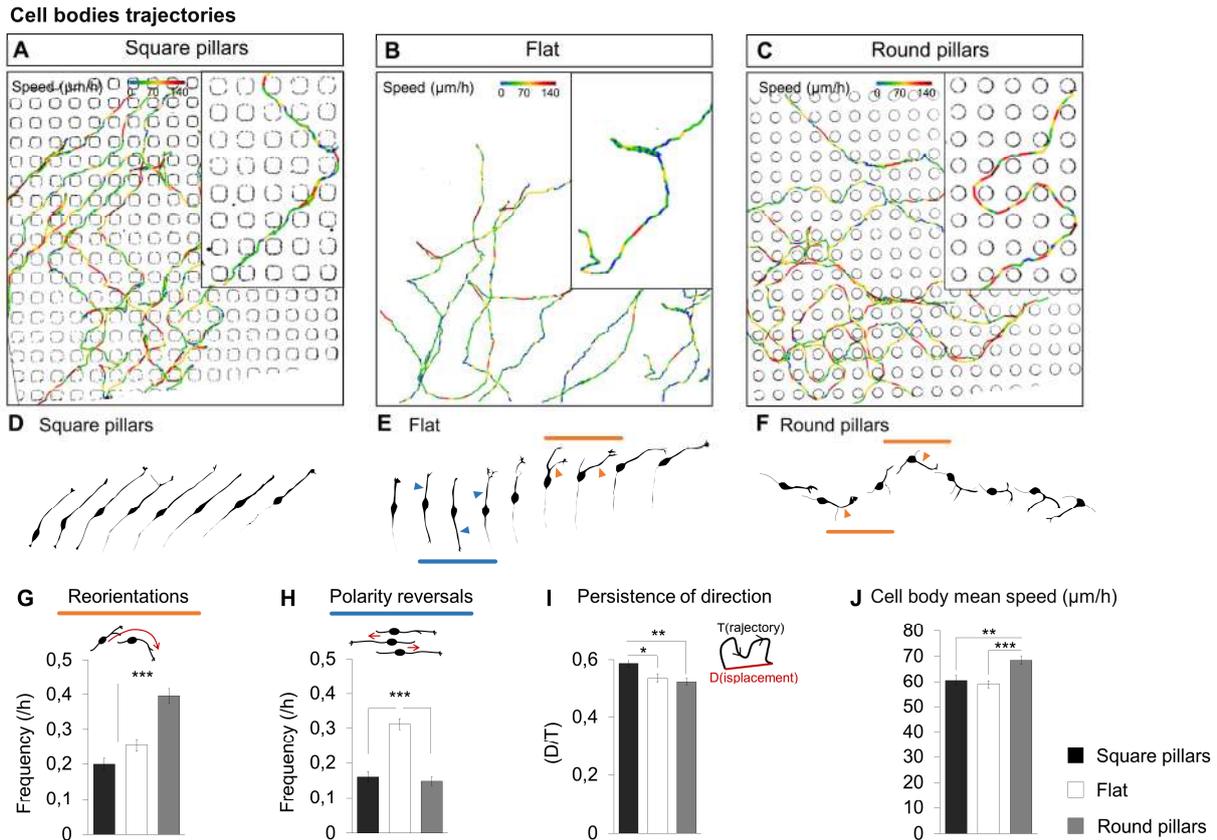


**C Interneuron morphology**



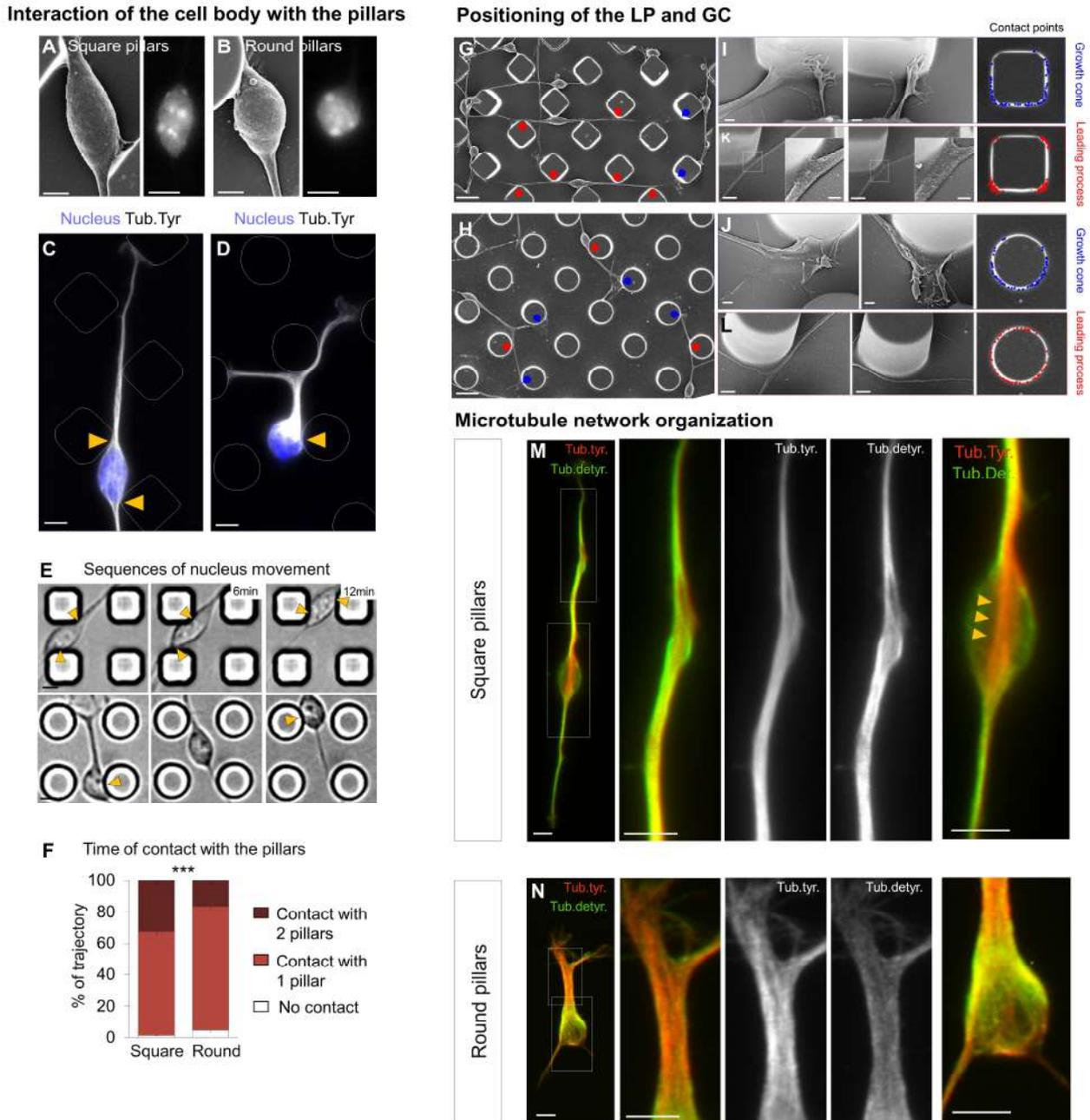
**Figure 2: Microtopography influences interneuron orientation and morphology**

(A) Schematics of the typical morphology of migrating interneurons and their cellular compartments. (B) Fixed explants of interneurons migrating in between square pillars (top), on flat surface (middle) or in between round pillars (bottom) after 24h of culture. Tyrosinated tubulin staining. Scale 50µm. Main leading process orientation was measured on n=3200 cells/condition (Flat: 5 cultures, square pillars: 3 cultures, round pillars: 4 cultures) in the peripheral area delimited by the dashed line on (A-C). Graphs represent the number of cells in each orientation. Chi2 test show that the distribution of cell orientation in square pillars is significantly different (\*\*\*) p<0.0001) from the distribution on flat or round pillars. (C) Interneurons at the leading front of migration on fixed cultures after 24h (tyrosinated tubulin staining. Scale 30µm) with representative examples of different morphologies of interneurons (scale 5µm) on the right column. (D) 3 categories of cell morphologies were established according to the number of bifurcations along the leading process, and the percentage of cells in each category measured. Square pillars n=411 cells (3 cultures), flat n=436 cells (3 cultures), round pillars n=379 cells (3 cultures). Error bars represent mean ± SEM. Stars above columns indicate differences between columns with Chi2 test. Stars within columns indicate differences within a single type of morphology (Fisher test). Black stars: compared with the other type of pillars, white stars: with flat (\*\*\*) p<0.0001, \*p<0.05). (E) Length of the main leading process measured on fixed explants at the front of the migration. Square pillars n=411 cells (3 cultures), flat n=436 cells (3 cultures), round pillars n=379 cells (3 cultures). Error bars represent mean ± SEM. Non-parametric ANOVA, Dunn’s post test (p<0.0001).



**Figure 3: Microtopography influence interneurons dynamic behavior**

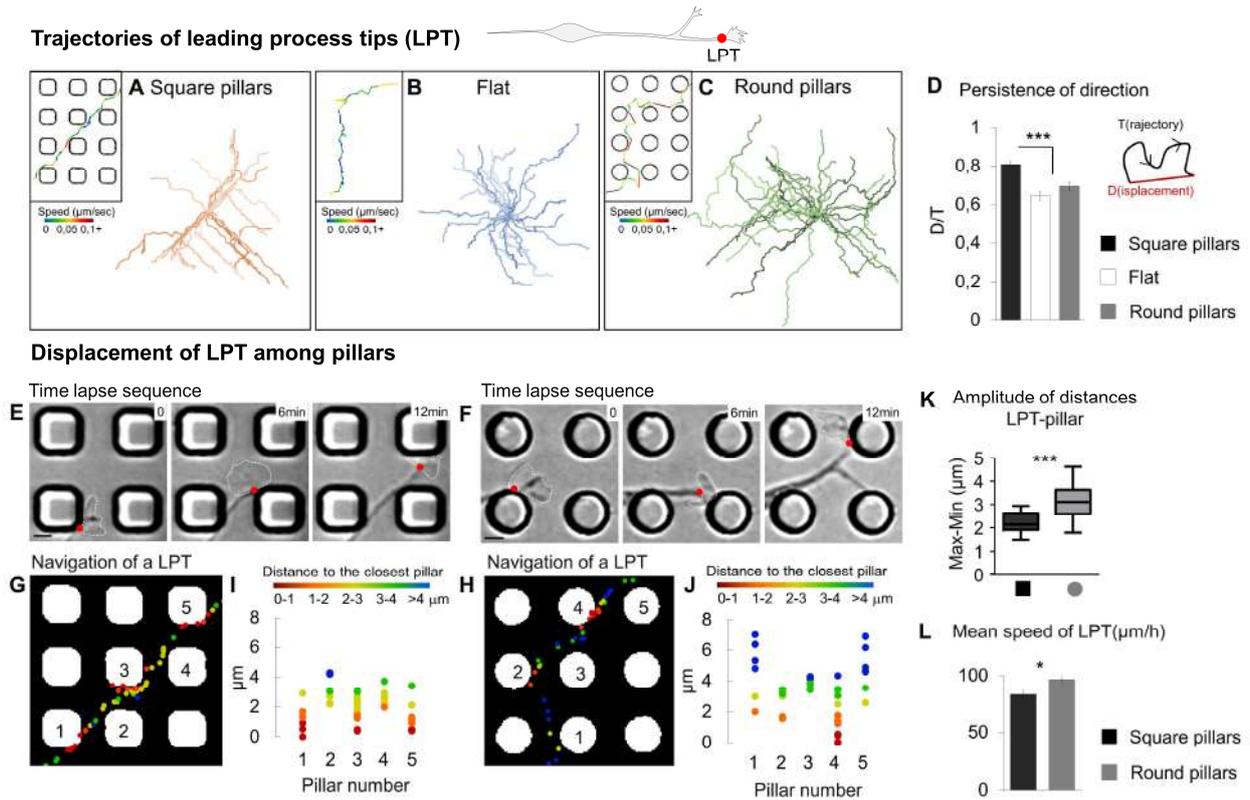
(A-C) Representative examples of cell body trajectories on flat, square and round pillars color coded with the instantaneous speed. (D-F) Cell shapes extracted from time lapse sequences of representative migrating interneurons. Interval between images: 18 minutes. Blue arrows indicate polarity reversals and orange arrows reorientation by selection of a new branch. (G) Frequency of reorientations (defined as a non-transient change of direction) along the trajectories of interneurons. Non-parametric ANOVA Dunn's post test ( $p < 0.0001$ ). (H) Frequency of polarity reversals (defined as the alternation between active leading and trailing process) along the trajectories of interneurons. Non-parametric ANOVA Dunn's post test ( $p < 0.0001$ ). (I) Persistence of direction calculated with the directionality ratio (ratio between the displacement and the length of the actual trajectory). Non-parametric ANOVA Dunn's post test ( $p = 0.0063$ ). (G,H,I) (J) Cell bodies mean speed ( $\mu\text{m/h}$ ). Non-parametric ANOVA Dunn's post test ( $p = 0.0002$ ). For all the analysis: square pillars  $n = 118$  cells (7 cultures), flat  $n = 114$  cells (5 cultures), round pillars  $n = 142$  cells (6 cultures). Error bars represent mean.  $\pm$  SEM.



**Figure 4: Interneurons positioning within pillared surfaces**

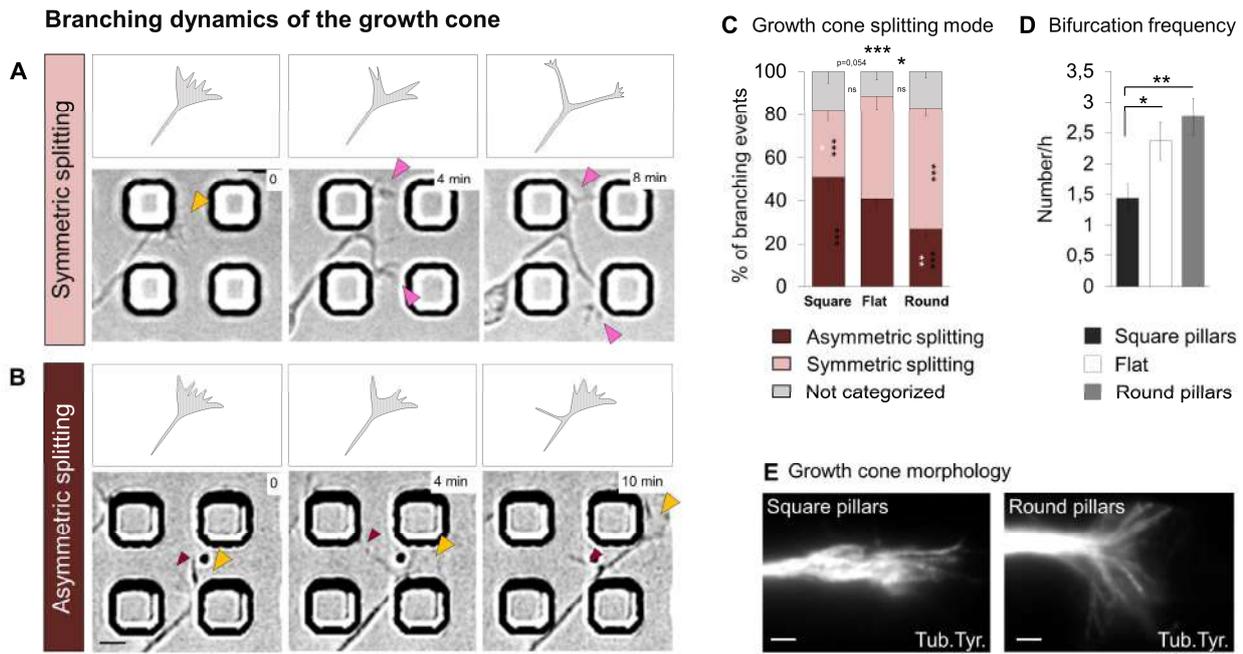
(A,B) Cell bodies visualized by SEM (left, scale 2µm) or Dapi staining (right, scale 5µm). (C,D) Immunostaining of representative cells against Dapi (blue) and tyrosinated tubulin (white). Yellow arrows illustrate the contacts between the cell body and the pillars. Scale 5µm. (E) Dynamic sequences extracted from phase contrast movies of the cell body movement (2-3h). Yellow arrows show contacts between the cell body and the pillars. Scale 10µm. (F) Time of contact of the cell body with no, one or two pillars at the same (expressed as the percentage of the trajectory). Square pillars n=30 cells (6 cultures), round pillars n=30 cells (5 cultures). Error bars represent mean –SEM. Chi2 test (p<0.0001). (G,H) Scanning electron microscopy (SEM) images of interneurons migrating in between square (G) or round pillars (H). Scale 10µm. Red dots show the contact points in between the leading process (LP) and the pillars and the blue dots the contact points in between the growth cone (GC) and the pillars. (I,J)

SEM images of GC morphologies and their points of contact with the square (G) or round (H) pillars. Scale 1 $\mu$ m. (K,L) SEM images showing LP interaction with the square (I) or round pillars (J) and their points of contact with the structures. Scale 2 $\mu$ m. Enlarged views scale 0.5 $\mu$ m. The contact points of the GC or LP with the structures was plotted on approximately 60 cells per condition from 3 different experiments. (M,N) Representative images of immunofluorescence against tyrosinated tubulin (dynamic microtubules, red) and detyrosinated tubulin (stable microtubules, green), at the level of the LP and cell body. Images are sum projections of z-stacks. Scale 5 $\mu$ m.



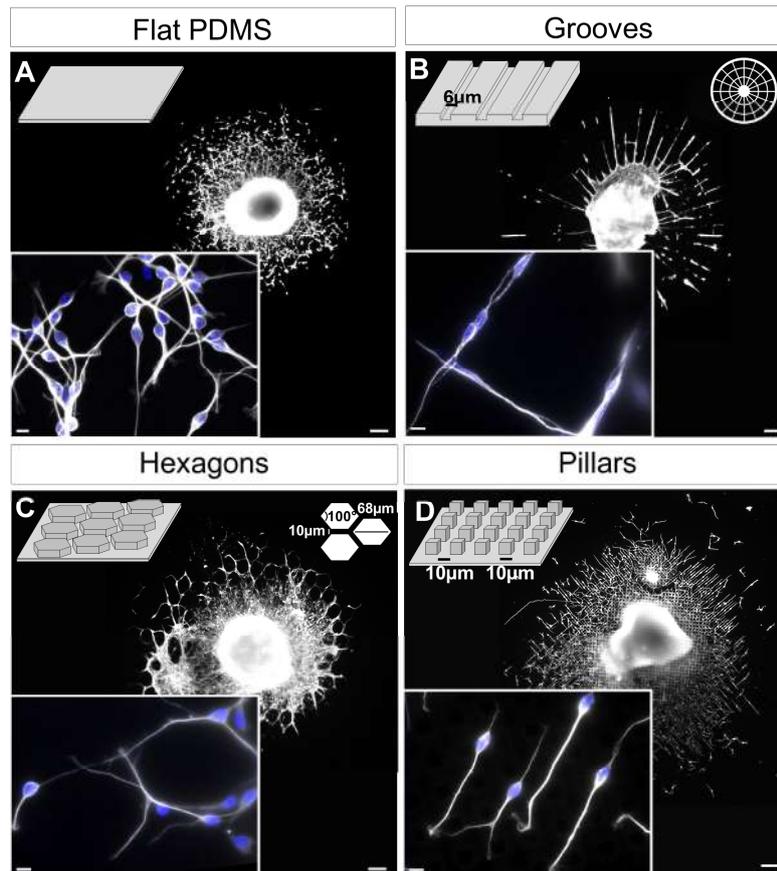
**Figure 5: Cell tip navigation in between pillars**

(A,B,C) Leading process tips (LPT) trajectories in between square pillars (A), on flat PDMS (B) and in between round pillars (C) with enlarged representative trajectories color coded with the instantaneous speed. (D) The persistence of direction is calculated with the directionality ratio (ratio between the displacement and the length of the actual trajectory). Square pillars n=30 cells (6 cultures), flat: n=23 cells (4 cultures), round pillars n=30 cells (5 cultures). Error bars represent mean ± SEM. One-way ANOVA Tukey’s post test (p<0.0001). (E,F) Dynamic sequences extracted from phase contrast movies of the GC movement, from which the LPT (red dots) was tracked for 2 to 3 hours. Scale 5μm. (G,H) Each LPT position is assigned to the closest pillar, and the distance LPT-pillar is calculated. Representative example of the successive positions of a LPT during 1 hour and 20 minutes color coded with the distance to the closest pillar. (I,J) Plots of the distribution of the distances LPT-pillars, representing the space explored around each pillar by the LPT. (K) Mean difference between the maximal and minimal distance LPT-pillar for each pillar, representing the amplitude of LPT exploration around pillars. Square pillars n=21 cells (6 cultures), round pillars n=29 cells (5 cultures). T-test (p<0.0001). (L) Mean speed of the LPT (μm/h). Square pillars n=29 cells (6 cultures), round pillars n=30 cells (5 cultures). Error bars represent mean ± SEM. T-test (p=0.0171).



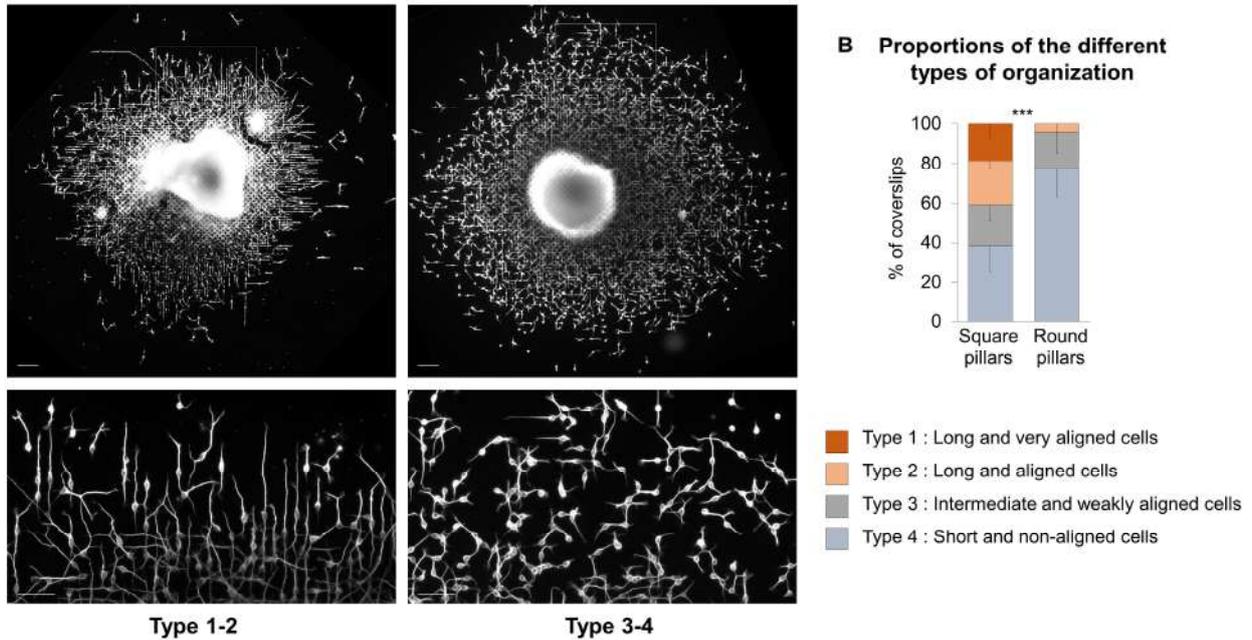
**Figure 6: Microtopography influences interneurons branching dynamics**

(A,B) Dynamic sequences of branching events extracted from phase contrast movies showing 2 modes of growth cone splitting leading to branch generation. (A) Symmetric splitting: the GC (yellow arrow) splits in the middle generating 2 active branches (pink arrows). (B) Asymmetric splitting: a lateral filopodia (brown arrow) from the main GC (yellow arrow) is generating a thin, inactive, quickly retracted branch. (C) On sequences of 2-3 hours of recordings of individual cells, each branching event was categorized and the percentage of the different mode of GC splitting was calculated. Square pillars n=23 cells (6 cultures), flat n=23 cells (4 cultures), round pillars n=30 cells (5 cultures). Error bars represent mean  $\pm$  SEM. Stars above columns indicate differences between columns with Chi2 test. Stars within columns indicate differences within a single type of splitting mode (Fisher test). Black stars: compared with the other type of pillars, white stars: with flat. (\*\*\*)  $p < 0.0004$ , \*\*  $p = 0.0073$ , \*  $p < 0.03$  (D) Branching frequency (number of branches formed/hour). Square pillars n=30 cells (6 cultures), flat n=22 cells (4 cultures), round pillars n=30 cells (5 cultures). Error bars represent mean  $\pm$  SEM. Non-parametric ANOVA, Dunn's post test ( $p = 0.0019$ ). (E) Representative images of GC morphology with tyrosinated tubulin staining. Scale 2  $\mu$ m.

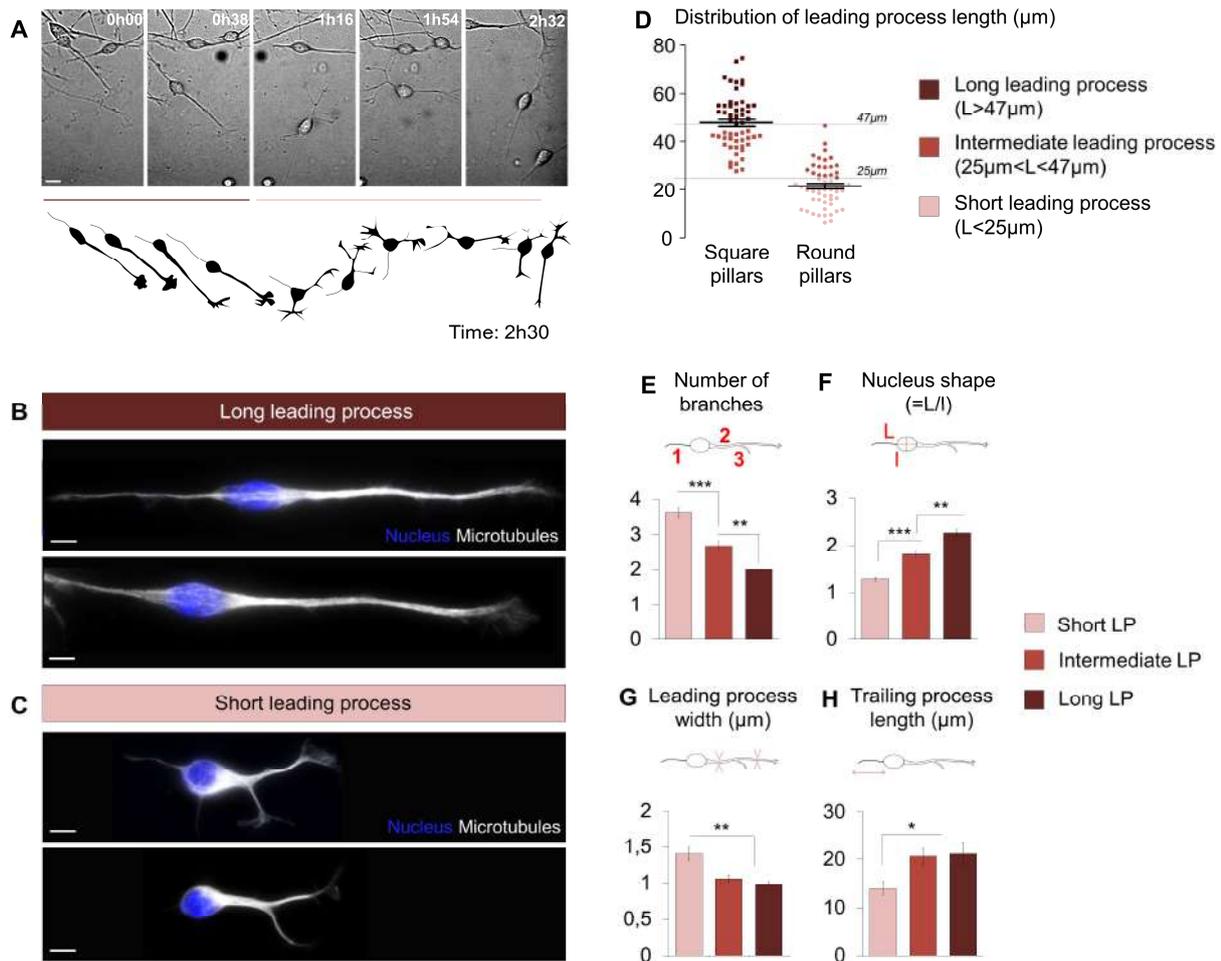


### Supplementary figure 1: Migration of interneurons on different geometries of topography

(A) Fixed explant of migrating interneurons on flat PDMS after 24h. Tyrosinated tubulin staining. Scale 100µm (B) Fixed explant of migrating interneurons in grooves (width 6 µm, height 10 µm) after 24h. Tyrosinated tubulin staining. Scale 100µm (C) Fixed explant of migrating interneurons in between hexagons (length 68 µm separated by 10µm) after 24h. Tyrosinated tubulin staining. Scale 100µm (D) Fixed explant of migrating interneurons in between square pillars (10 µm size and height separated by 10 µm) after 24h. Tyrosinated tubulin staining. Scale 100µm. For the enlarged view, nucleus is visualized by Dapi staining (blue) and the cell by tyrosinated tubulin staining (grey). Scale 10µm.

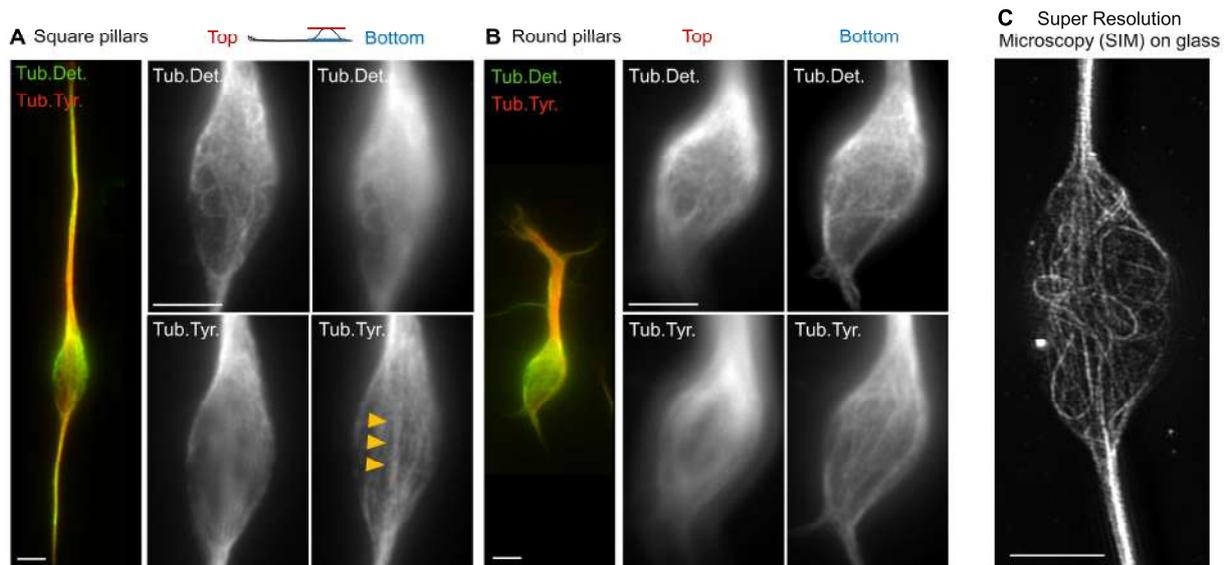
**A Macroscopic organization of the cultures****Supplementary figure 2: Different macroscopic organization of migrating interneurons cultures**

(A) Fixed explants after 24h of migration showing different macroscopic organization of the cultures. Scales: 100µm (top), 50µm (bottom). (B) The proportions of the different types of organization among the cultures were calculated (n=8 independent experiments). Error bars represent mean – SEM. Chi2 test indicate a significant difference (\*\*\*) p<0.0001) between square and round pillars.



**Supplementary figure 3: Detailed morphological characterization of the two morphotypes**

(A) Time lapse sequence and extracted cell shape of an interneuron migrating on a flat surface. Total time 2h30, interval between images: 19 minutes. Scale 10µm. (B,C) Representative examples of the 2 morphotypes observed. Nucleus is visualized by Dapi staining (blue) and the cell by tyrosinated tubulin staining (white). Scale 5µm. (D) On fixed cultures from square and round pillars, cells of the 2 morphotypes were selected (55 long and unbranched cells from 6 cultures and 56 short and branched cells from 4 cultures). The distribution of the leading process (LP) length is represented. 3 categories of cells were defined according to the length of their LP. (E) Mean number of branches (from the cell body or LP) in the 3 categories of LP length. Non-parametric ANOVA, Dunn’s post test ( $p < 0.0001$ ) (F) Mean nucleus shape (defined by the ratio between the lengths of the long and short axis of the nucleus). Non-parametric ANOVA, Dunn’s post test ( $p < 0.0001$ ). (G) Mean LP width (average of 3 measures along the whole length of the LP). Non-parametric ANOVA, Dunn’s post test ( $p = 0.0004$ ) (H) Mean trailing process (TP) length. Non-parametric ANOVA, Dunn’s post test ( $p = 0.0069$ ). Long LP  $n = 28$  cells (6 cultures). Intermediate LP  $n = 46$  cells (10 cultures). Short LP  $n = 37$  cells (5 cultures). Error bars represent mean  $\pm$  SEM.



**Supplementary figure 4: Microtubules network organization at the cell body**

(A,B) Representative images of immunofluorescence against tyrosinated tubulin (dynamic microtubules, red) and detyrosinated tubulin (stable microtubules, green) at the level of the cell body (top or bottom, against the substrate). Images are sum projections of z-stacks. Scale 5 $\mu$ m. (C) Super resolution microscopy (SIM) images of the organization of stable microtubules (detyrosinated tubulin staining) at the level of the cell body on a flat surface (glass coverslip). Scale 5 $\mu$ m.

## References

1. Francis, F. et al. Human disorders of cortical development: From past to present. *European Journal of Neuroscience* (2006). doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04649.x
2. Marcorelles, P. et al. Evidence for tangential migration disturbances in human lissencephaly resulting from a defect in LIS1, DCX and ARX genes. *Acta Neuropathol.* **120**, 503–15 (2010).
3. Marín, O. & Rubenstein, J. L. R. Cell migration in the forebrain. *Annu. Rev. Neurosci* **26**, 441–83 (2003).
4. Tanaka, D., Nakaya, Y., Yanagawa, Y., Obata, K. & Murakami, F. Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins. *Development* **130**, 5803–13 (2003).
5. Tanaka, D. H., Maekawa, K., Yanagawa, Y., Obata, K. & Murakami, F. Multidirectional and multizonal tangential migration of GABAergic interneurons in the developing cerebral cortex. *Development* **133**, 2167–76 (2006).
6. Tanaka, D. H. et al. Random walk behavior of migrating cortical interneurons in the marginal zone: time-lapse analysis in flat-mount cortex. *J. Neurosci.* **29**, 1300–11 (2009).
7. Polleux, F., Whitford, K. L., Dijkhuizen, P. A., Vitalis, T. & Ghosh, A. Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development* **129**, 3147–60 (2002).
8. Martini, F. J. et al. Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. *Development* **136**, 41–50 (2009).
9. Britto, J. M., Johnston, L. A. & Tan, S.-S. The Stochastic Search Dynamics of Interneuron Migration. *Biophys. J.* **97**, 699–709 (2009).
10. Wichterle, H., Alvarez-Dolado, M., Erskine, L. & Alvarez-Buylla, A. Permissive corridor and diffusible gradients direct medial ganglionic eminence cell migration to the neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 727–32 (2003).
11. Flames, N. et al. Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* **44**, 251–61 (2004).
12. López-Bendito, G. et al. Chemokine signaling controls intracortical migration and final distribution of GABAergic interneurons. *J. Neurosci.* **28**, 1613–24 (2008).
13. Zimmer, G. et al. Bidirectional ephrinB3/EphA4 signaling mediates the segregation of medial ganglionic eminence- and preoptic area-derived interneurons in the deep and superficial migratory stream. *J. Neurosci.* **31**, 18364–80 (2011).
14. Métin, C. & Godement, P. The Ganglionic Eminence May Be an Intermediate Target for Corticofugal and Thalamocortical Axons. *J. Neurosci.* 3219–3235 (1996).

15. Denaxa, M., Chan, C. H., Schachner, M., Parnavelas, J. G. & Karagogeos, D. The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development* **128**, 4635–44 (2001).
16. Brown, K. N. et al. Clonal production and organization of inhibitory interneurons in the neocortex. *Science* **334**, 480–6 (2011).
17. Barnes, J. M., Przybyla, L. & Weaver, V. M. Tissue mechanics regulate brain development, homeostasis and disease. *J. Cell Sci.* **130**, 71–82 (2017).
18. Gangatharan, G., Schneider-Maunoury, S. & Breau, M. A. Role of mechanical cues in shaping neuronal morphology and connectivity. *Biol. Cell* **110**, 125–136 (2018).
19. Koser, D. E. et al. Mechanosensing is critical for axon growth in the developing brain. *Nat. Neurosci.* **19**, 1592–1598 (2016).
20. Breau, M. A. et al. Extrinsic mechanical forces mediate retrograde axon extension in a developing neuronal circuit. *Nat. Commun.* **8**, 282 (2017).
21. Iwashita, M., Kataoka, N., Toida, K. & Kosodo, Y. Systematic profiling of spatiotemporal tissue and cellular stiffness in the developing brain. *Development* **141**, 3793–8 (2014).
22. Nguyen, A. T., Sathe, S. R. & Yim, E. K. F. From nano to micro: topographical scale and its impact on cell adhesion, morphology and contact guidance. *J. Phys. Condens. Matter* **28**, 183001 (2016).
23. Hoffman-Kim, D., Mitchel, J. A. & Bellamkonda, R. V. Topography, cell response, and nerve regeneration. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **12**, 203–31 (2010).
24. Yim, E. K. F. et al. Nanopattern-induced changes in morphology and motility of smooth muscle cells. *Biomaterials* **26**, 5405–5413 (2005).
25. Kim, D. H. et al. Mechanosensitivity of fibroblast cell shape and movement to anisotropic substratum topography gradients. *Biomaterials* **30**, 5433–44 (2009).
26. Frey, M. T., Tsai, I. Y., Russell, T. P., Hanks, S. K. & Wang, Y. L. Cellular responses to substrate topography: Role of myosin II and focal adhesion kinase. *Biophys. J.* **90**, 3774–82 (2006).
27. Ghibaudo, M. et al. Substrate topography induces a crossover from 2D to 3D behavior in fibroblast migration. *Biophys. J.* **97**, 357–68 (2009).
28. Berry, C. C., Campbell, G., Spadiccino, A., Robertson, M. & Curtis, A. S. G. The influence of microscale topography on fibroblast attachment and motility. *Biomaterials* **25**, 5781–8 (2004).
29. Jeon, H. et al. Directing cell migration and organization via nanocrater-patterned cell-repellent interfaces. *Nat. Mater.* **14**, 918–23 (2015).
30. Liu, Y. et al. Effects of fiber orientation and diameter on the behavior of human dermal fibroblasts on electrospun PMMA scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A* **90**, 1092–106 (2009).
31. Chaurey, V. et al. Nanofiber size-dependent sensitivity of fibroblast directionality to the methodology for scaffold alignment. *Acta Biomater.* **8**, 3982–3990 (2012).

32. Higginbotham, H. et al. Arl13b in primary cilia regulates the migration and placement of interneurons in the developing cerebral cortex. *Dev. Cell* **23**, 925–38 (2012).
33. Nery, F. C. et al. New methods for investigation of neuronal migration in embryonic brain explants. *J. Neurosci. Methods* **239**, 80–4 (2015).
34. Luccardini, C. et al. N-cadherin sustains motility and polarity of future cortical interneurons during tangential migration. *J. Neurosci.* **33**, 18149–60 (2013).
35. Luccardini, C., Leclech, C., Viou, L., Rio, J.-P. & Métin, C. Cortical interneurons migrating on a pure substrate of N-cadherin exhibit fast synchronous centrosomal and nuclear movements and reduced ciliogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 286 (2015).
36. Zhou, F., Yuan, L., Huang, H. & Chen, H. Phenomenon of contact guidance on the surface with nano-micro-groove-like pattern and cell physiological effects. *Chinese Sci. Bull.* **54**, 3200–3205 (2009).
37. Lysko, D. E., Putt, M. & Golden, J. A. SDF1 regulates leading process branching and speed of migrating interneurons. *J. Neurosci.* **31**, 1739–45 (2011).
38. Kappeler, C. et al. Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from doublecortin knockout mice. **15**, 1387–400 (2006).
39. Anava, S., Greenbaum, A., Ben Jacob, E., Hanein, Y. & Ayali, A. The regulative role of neurite mechanical tension in network development. *Biophys. J.* **96**, 1661–70 (2009).

# Seconde partie

Résultats complémentaires



---

# Résultats complémentaires

---

## Sommaire

---

### **2.1 Mise au point du système expérimental**

2.1.1 Développement d'un protocole de fabrication de substrats microstructurés pour la culture primaire d'interneurones en migration

2.1.1.1 Fabrication du moule original par photolithographie

2.1.1.2 Fabrication de la lamelle finale par moulages de PDMS

2.1.1.3 Fonctionnalisation de la surface par dépôt de molécules d'adhésions

2.1.1.4 Culture primaire d'interneurones en migration

2.1.2 Test et choix du type de géométrie de topographie

2.1.2.1 Premiers tests de substrats mixtes N-cadhérine et laminine sur du verre

2.1.2.2 Influence des molécules d'adhésion sur les substrats microstructurés

2.1.3 Test et choix du type de molécules d'adhésion

2.1.4 Caractérisation cellulaire des cultures

2.1.5 Organisation macroscopique et variabilité entre les cultures

### **2.2 Caractérisation intracellulaire approfondie des interneurones en migration sur les deux substrats de plots**

2.2.1 Position du centrosome dans les interneurones en migration

2.2.2 Organisation des adhésions focales

2.2.3 Organisation des comètes EB1

2.2.4 Organisation de la tubuline acétylée

2.2.5 Organisation de la myosine IIB

---

Cette partie présente un ensemble d'informations et de résultats qui ne figurent pas dans l'article scientifique précédent mais qui le complètent de manière intéressante. Elle est divisée en deux chapitres :

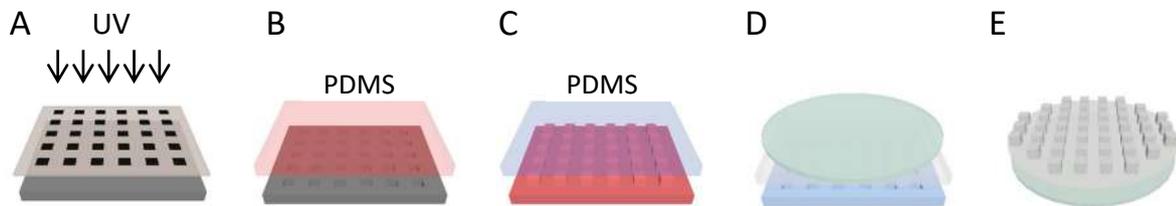
Le premier présente tout le travail initial de développement et de mise au point du système expérimental utilisé dans cette étude. Il comprend pour commencer les différentes étapes du protocole complet, de la microfabrication à la culture primaire d'interneurones en migration. La partie microfabrication est particulièrement détaillée et commentée afin de justifier les différents choix techniques et les éventuelles difficultés rencontrées. Je présente ensuite différents résultats de mise au

point (type et forme du relief, molécules d'adhésion) et de caractérisation du système expérimental (types cellulaires et organisation générale de la migration).

Le second chapitre présente un ensemble de résultats de caractérisation de l'organisation intracellulaire des interneurons en migration entre plots ronds et plots carrés. Ces résultats n'ont pas été inclus dans l'article mais apportent des éléments intéressants d'éclairage et de discussion.

## 2.1 Mise au point du système expérimental

### 2.1.1 Développement d'un protocole de fabrication de substrats microstructurés pour la culture primaire d'interneurones en migration



**Figure 31 |** Etapes du protocole de fabrication des lamelles microstructurées

(A) Exposition de la résine photosensible déposée sur une plaque de silicium à travers un masque de quartz (B) Fabrication du 1er contre-moule en PDMS épais (rouge) à partir du moule original de résine (gris foncé) (C) Fabrication du 2ème contre-moule en PDMS épais (bleu) (D) Dépôt d'une fine couche de PDMS (gris clair) sur le 2ème contre-moule puis d'une lamelle de verre (vert) (E) Obtention de la lamelle de culture finale après démoulage

#### 2.1.1.1 Fabrication du moule original par photolithographie

- 
- Dépôt de la résine
  - Exposition aux UV
  - Développement
- 

Le moule original est fabriqué selon des méthodes classiques de photolithographie, et composé d'une couche de résine photosensible sur une plaque de silicium (Figure 31A). Il existe deux types de résine photosensible : des résines dites « positives », dont les parties exposées aux UV sont dissoutes au développement, et des résines « négatives » dont les parties non exposées sont dissoutes au développement. J'ai utilisé pour ce protocole une résine négative permettant d'obtenir un moule avec des structures en « creux », inverse du relief que l'on veut obtenir au final. Cette polarité inversée permet de maximiser la surface de résine et de limiter la fragilité du moule et des microstructures face aux futurs moulages et démoulages dont il va faire l'objet. Ceci est particulièrement important pour les reliefs de micro-plots qui peuvent facilement s'arracher quand ils sont saillants. Le moule original de polarité négative (plots en creux) peut ainsi être gardé et réutilisé de nombreuses fois, ce qui accélère grandement le processus de fabrication des lamelles microstructurées.

Le dépôt de la résine photosensible est une étape importante qui assure la solidité du moule, l'homogénéité de la surface et la résolution finale des structures. Les paramètres de durée et vitesse de

rotation définissent la hauteur finale de la couche de résine (donc des microstructures) et dépendent du type de résine et de sa viscosité. Les temps de séchage, exposition et développement qui suivent dépendent de la hauteur de la couche de résine déposée.

### Etapes du protocole

- Laisser la plaque de silicium (« silicon wafer ») sur une plaque chauffante à 200°C pendant 5 à 30 minutes
  - *Optionnel, améliore l'attachement de la résine à la plaque de silicium*
- Dépôt de la couche de résine photosensible SU8-2010 : 500 tours/min pendant 10 secondes puis 3000 tours/min pendant 30 secondes
  - *Paramètres pour une hauteur de 10 $\mu$ m*
- Laisser la résine sécher 1 minute à 65°C et 2 minutes à 95°C
  - *Permet l'évaporation des solvants et le durcissement de la résine*
- Exposition sous UV à travers un masque de quartz de 10 secondes
  - *On peut optimiser cette étape en exposant successivement plusieurs zones sur la même plaque, ce qui permet d'augmenter le nombre de lamelles générées/moule*
- Laisser le moule 1 minute à 65°C et 3 minutes à 95°C
  - *Pendant cette étape, le motif doit apparaître progressivement, signe d'une bonne exposition*
- Développement 2 minutes et 30 secondes sous agitation
  - *Les zones négatives (non exposées) vont être dissoutes*
- Nettoyer le moule avec de l'isopropanol, le sécher et le laisser sur la plaque chauffante à 200°C pendant 5 à 30 minutes
  - *Permet de limiter des éventuelles craquelures sur la résine*

### 2.1.1.2 Fabrication de la lamelle finale par moulages de PDMS

- Deux étapes de contre-moules épais de PDMS (Figure 31B,C)
- Fine couche de PDMS microstructuré sur une lamelle de verre (Figure 31C, D)

Les différentes étapes qui suivent sont motivées par l'obtention d'une lamelle de culture finale composée d'une fine couche de PDMS microstructurée solidaire d'une lamelle de verre. Cette organisation présente plusieurs avantages : la lamelle est facilement manipulable comme une lamelle de culture classique et peut donc s'adapter à différents supports de cultures et être ensuite utilisée pour des expériences d'immunomarquages. La fine couche de PDMS permet par ailleurs de garder une bonne qualité optique pour les expériences de microscopie à fluorescence, sur cellules vivantes et fixées.

Le démoulage de cette fine couche de PDMS associée à la lamelle de verre est une étape délicate qui ne peut pas se faire directement sur le moule de résine (le moule est trop rigide et les structures trop fragiles). J'ai donc ajouté ces deux étapes de contre moulage dont la dernière me procure un moule épais de PDMS de polarité négative, sur lequel est coulée et démoulée la fine couche de PDMS microstructurée associée à la lamelle de verre.

#### Etapes du protocole

- Traiter le moule de résine 30 secondes dans un four à plasma à oxygène et le silaniser avec du Tridecafluoro-1,1,2,2 tetrahydrooctyltrichlorosilane (AB111444) 20 minutes sous une cloche à vide
  - Rend la surface hydrophobe et permet le bon démoulage du PDMS qui va suivre
- Fixer le moule au fond d'une grande boîte de pétri en plastique et couler au moins 1cm de PDMS (Sylgard, ratio 1 :10). Dégazer sous une cloche à vide et laisser polymériser sur la nuit à 70°C
  - Une épaisseur minimale de PDMS permet au contre-moule de moins se déformer avec la chaleur
- Démouler le PDMS, le traiter au plasma 30 secondes et le silaniser 20 minutes sous vide
  - Ce premier contre-moule peut être réutilisé environ 5 fois
- Fixer à nouveau ce moule au fond d'une grande boîte de pétri en plastique et couler au moins 1cm de PDMS. Dégazer et laisser polymériser sur la nuit à 70°C
- Démouler le PDMS, le traiter au plasma 30 secondes et le silaniser 20 minutes sous vide
  - Ce moule n'est utilisé qu'une fois, car l'étape suivante de démoulage en abîme souvent les structures

- Sur ce second contre-moule, déposer par centrifugation (3000 tours/min pendant 30 secondes) une fine couche de PDMS
  - *Avant cette étape, penser à délimiter sous le moule au marqueur les zones microstructurées. En effet, celles-ci ne sont plus visibles une fois le PDMS déposé. Les paramètres présentés donnent une épaisseur de PDMS théorique d'une trentaine de  $\mu\text{m}$*
- Déposer et centrer rapidement des lamelles de verre sur les motifs microstructurés, dégazer au moins 10 minutes et laisser polymériser sur la nuit à 70°C
  - *Le PDMS doit être encore liquide pour assurer une bonne cohésion avec la lamelle de verre. Le dégazage permet d'enlever des bulles d'air souvent présentes entre le PDMS et la lamelle après son dépôt*
- Détacher doucement les lamelles microstructurées à l'aide d'un scalpel et d'isopropanol
  - *L'isopropanol est indispensable pour aider au détachement des lamelles*

### 2.1.1.3 Fonctionnalisation de la surface par dépôt de molécules d'adhésion

---

- *Dépôt de Poly-L-Lysine (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )*
  - *Dépôt de laminine (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) et anticorps anti Fc humain (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )*
  - *Dépôt de N-cadhérine (0,25 $\mu\text{g}/\text{lamelle}$ )*
- 

Ces étapes de dépôt de molécules d'adhésion sont les mêmes que pour une culture classique sur simple lamelle de verre. Elles sont détaillées plus en avant dans (Leclech and Métin, 2018).

Le dépôt de molécules d'adhésion présentes dans l'environnement extracellulaire est indispensable pour l'attachement, la migration et la survie des interneurons. Le choix des molécules d'adhésion et leur concentration a fait l'objet d'un travail de mise au point que nous allons détailler par la suite.

#### Étapes du protocole

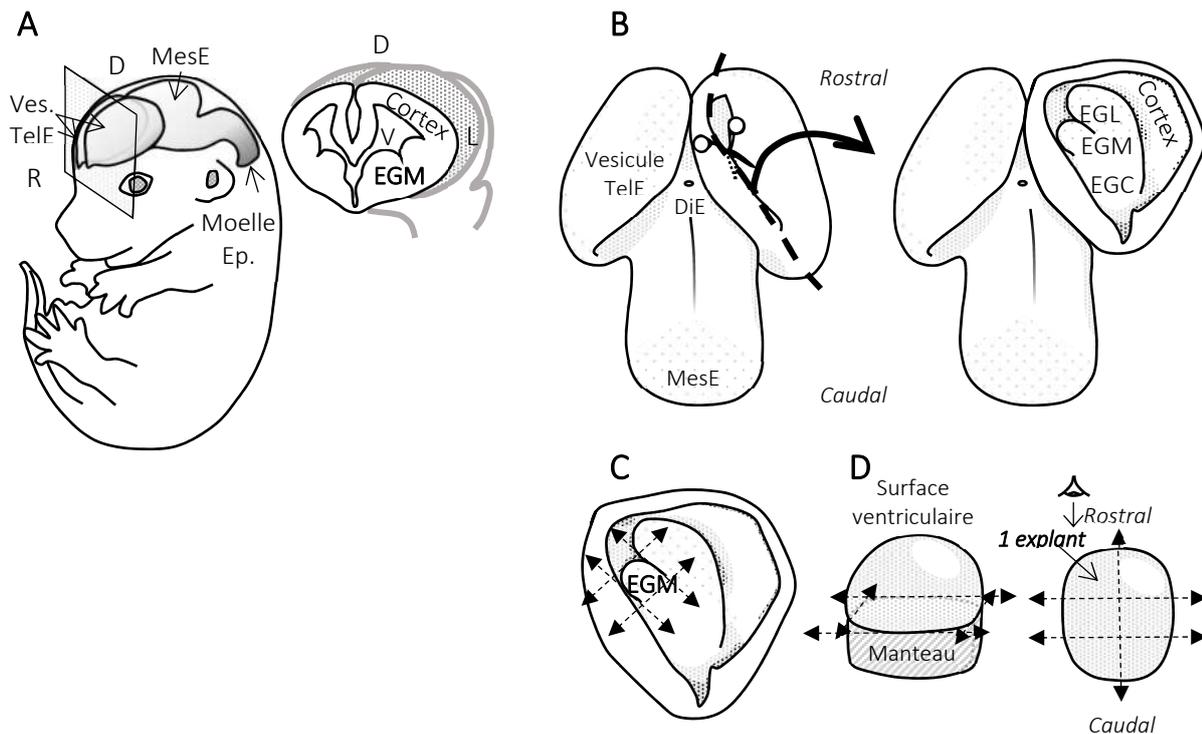
- Avant la culture, les lamelles microstructurées sont soniquées dans de l'éthanol 10 minutes puis rincées à l'eau
  - *Permet de nettoyer la surface du PDMS et de stériliser les lamelles*
- Les lamelles sont déposées dans une boîte de culture, ou montées en boîte vidéo

- La veille de la culture : les lamelles sont passées 30 secondes au plasma, puis on dépose rapidement une goutte de Poly-L-Lysine diluée à 200µg/mL dans l'eau à leur surface. Laisser incuber au moins 3h à 37°C dans l'incubateur
  - *Le passage au plasma permet d'activer la surface et de la rendre hydrophile, indispensable pour le dépôt des molécules d'adhésion*
- Rincer 3 fois à l'eau et laisser sécher 10 minutes
  - *Le temps de séchage est important mais ne doit pas être trop long, sinon la surface de PDMS perd ses propriétés hydrophiles*
- Déposer un mélange de laminine à 8µg/mL et l'anticorps humain IgG Fc à 4µg/mL dans du tampon borate. Laisser sur la nuit à 4°C
  - *A partir de cette étape, la lamelle ne doit jamais sécher au risque de dénaturer les protéines d'adhésion*
- Le matin de la dissection : rincer une fois au tampon borate et déposer 0,25µg de N-cadhérine par lamelle. Laisser incuber 2h à 37°C
  - *La N-cadhérine recombinante est une fusion entre le domaine extracellulaire et le récepteur Fc humain qui va se fixer à l'anticorps anti-Fc déjà présent à la surface de la lamelle*
- Déposer une goutte de tampon de saturation (BSA 1,5% dans tampon borate) et laisser incuber 10 minutes à température ambiante
  - *Sature les sites d'anticorps non liés à la N-cadhérine*
- Remplacer le tampon de saturation par le milieu de culture et laisser les lamelles en attente dans l'incubateur

## 2.1.1.4 Cultures primaires d'interneurones en migration

- Extraction des cerveaux d'embryons de souris E12,5
- Extraction de l'EGM
- Découpe et mise en culture des explants

Les étapes de la dissection sont détaillées dans (Leclech and Métin, 2018) et ci-dessous (Figure 32).



**Figure 32 | Etapes de la dissection des explants d'EGM d'embryons de souris**

(A) Extraction des embryons E12,5 et du cerveau. Abréviations : Ves. TelE : Vésicules télencéphaliques. MesE : mésencéphale. Moelle Ep. : moelle épinière. VL : ventricule latéral. EGM : éminence ganglionnaire médiane. D : dorsal, R : rostral, L : latéral (B) Ouverture des vésicules télencéphaliques. Abréviations : DiE : diencephale. EGL : éminence ganglionnaire latérale. EGC : éminence ganglionnaire caudale. (C) Découpe et extraction de l'EGM (D) Découpe de l'EGM en explants. Extrait de (Leclech and Métin, 2018).

### Etapes du protocole

- Le matin de la culture : sacrifier la souris gestante et extraire les embryons
  - On utilise des embryons au stade E12,5 pour lesquels la meilleure migration est obtenue
- Extraire le cerveau des embryons
- Ouvrir les deux vésicules télencéphaliques pour accéder à l'EGM
- Découper et extraire l'EGM

- Recouper chaque EGM en 6 morceaux équivalents : les explants
  - *Tous les explants doivent avoir une taille similaire et contenir une partie de la zone ventriculaire*
- Transférer les explants sur la lamelle microstructurée et les faire adhérer à la surface de la lamelle
  - *Cette étape est la plus délicate. Il faut appuyer sur les explants assez pour qu'ils ne se décollent pas, mais sans excès toutefois pour ne pas les détruire. On place les explants d'une EGM sur une lamelle.*
- Mettre les lamelles rapidement à 37°C dans l'incubateur. Les premiers interneurones commencent à migrer hors de l'explant après 4 à 6 heures de culture. Les interneurones migrent de manière soutenue pendant 24h environ. Pendant cette période, leur migration peut être enregistrée par vidéomicroscopie. A la fin de la migration, les cultures sont fixées et on peut ensuite y effectuer des immunomarquages.

### 2.1.2 Test et choix du type de géométrie de topographie

Dans la littérature, différentes catégories de topographie artificielle ont été utilisées, dans le but ultime de se rapprocher de l'environnement cellulaire physiologique et d'en reproduire une composante afin d'étudier son influence sur les comportements cellulaires. Deux grandes catégories de topographie peuvent être distinguées : des reliefs de tranchées parallèles, qui reproduisent par exemple des fibres (de collagène, des axones, etc.) présentes dans l'environnement extracellulaire, ou des reliefs de forêts de plots (ou cônes), qui peuvent figurer des surfaces rugueuses ou d'autres corps cellulaires. Pour ces deux types de topographie, une large gamme de dimensions a été explorée (du nanomètre au micromètre) et conduisent à des comportements cellulaires différents, illustrant l'extrême sensibilité et complexité des réponses des cellules à la topographie de leur environnement (voir Introduction, chapitre 2, §2.3).

Au début de ce projet, où aucune étude n'avait encore exploré la réponse des interneurones corticaux à la topographie, j'ai donc d'abord commencé par tester différents types et dimensions de relief : des tranchées (rectilignes, larges de 6 $\mu$ m, ou en dents de scie, larges de 20 $\mu$ m), des plots (de taille et écartement de 10 $\mu$ m), et des reliefs plus « intermédiaires » d'hexagones de différentes tailles laissant entre eux des chemins continus (de 10 $\mu$ m de large) avec des intersections plus ou moins fréquentes (Figure 33). Dans tous les cas, les structures sont micrométriques et hautes de 10 $\mu$ m, forçant les cellules à migrer au fond/entre les structures, au contact du substrat.

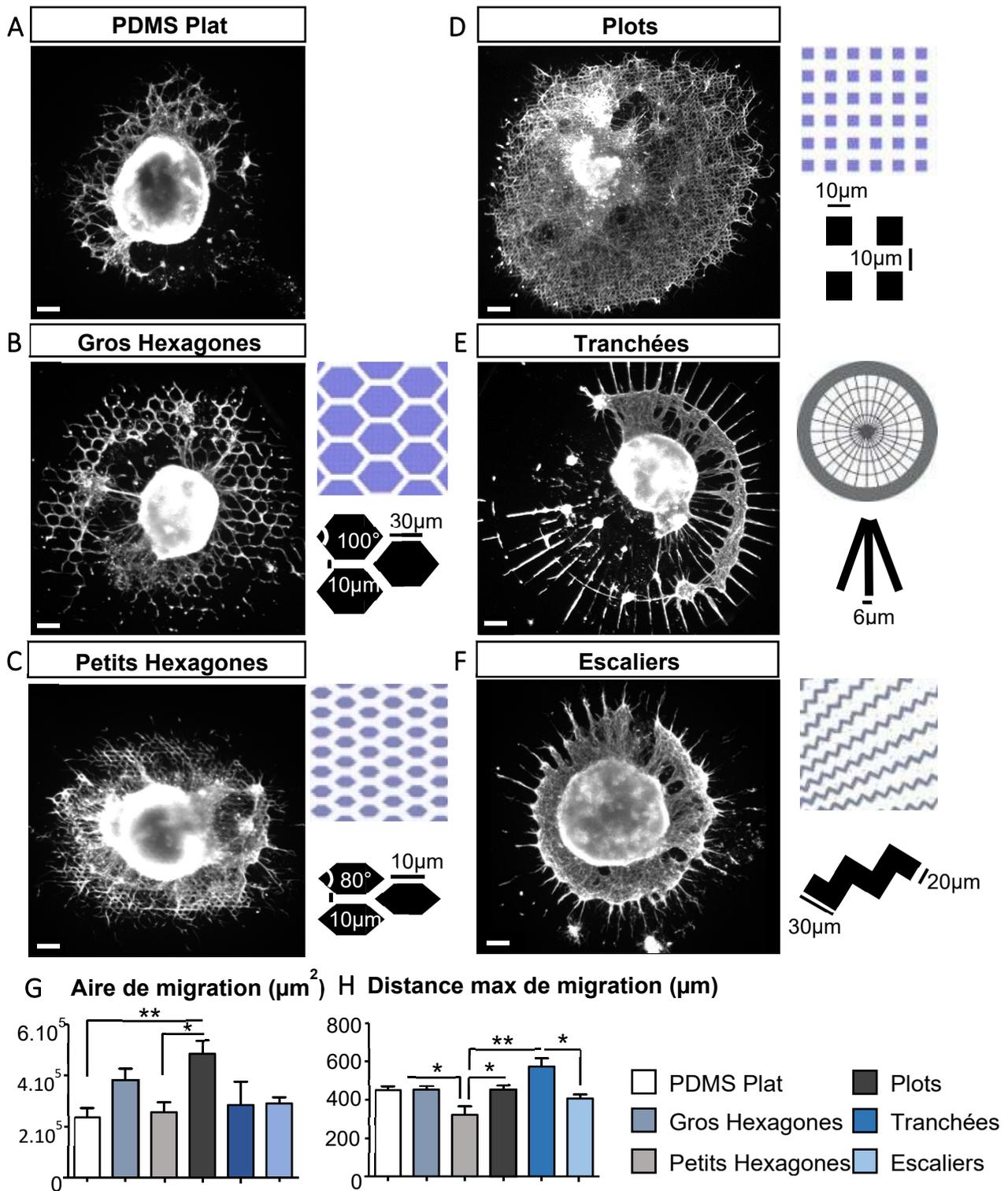


Figure 33 | Test de différentes géométries de topographie

(A-F) Migration des interneurons hors de l'explant sur différentes géométries de topographie après 24h de culture. Marquage tubuline tyrosinée. Echelle 100 $\mu\text{m}$ . (G) Mesure de l'aire de la couronne de migration après 24h autour de l'explant pour les différentes géométries de topographie. (H) Mesure de la distance maximale atteinte par les interneurons après 24h pour les différentes géométries de topographie. Plat n=17 explants, 2 cultures. Gros Hexagones n=30 explants, 2 cultures. Petits Hexagones n=13 explants, 2 cultures. Plots n=23 explants, 2 cultures. Tranchées n=8 explants, 1 culture. Escaliers n=10 explants, 1 culture. Test Anova, Tukey's post-test

La migration a d'abord été évaluée par l'organisation macroscopique de la tâche de migration autour de l'explant d'origine fixé après 24h de culture. Deux paramètres y ont été mesurés pour quantifier en partie cette organisation : l'aire de migration (aire de la tâche de migration moins aire de l'explant, Fig.33G) et la distance maximale de migration (distance atteinte par la cellule la plus lointaine, Fig.33H). Ces premières observations et mesures générales nous ont révélé des réponses cellulaires très différentes en fonction du type de relief. Pour commencer, on peut noter qu'aucune topographie ne diminue la migration par rapport à une surface plane (Fig.33G). Dans les tranchées rectilignes, les cellules migrent en chaîne assez rapidement, ce qui promeut de grandes distances maximales de migration depuis l'explant (Fig.33E,H). En revanche, on observe à la fin de la migration de grandes densités cellulaires et la formation d'agrégats. Par ailleurs, les fortes contraintes spatiales générées par les tranchées de largeur 6 $\mu$ m conduisent les interneurons à adopter une morphologie bipolaire non branchée peu physiologique. A l'inverse, la nappe d'interneurones en migration entre des plots est homogène, et promeut la migration de cellules individuelles montrant des morphologies branchées plus physiologiques. L'aire maximale de la tâche de migration après 24h de culture est obtenue sur ce relief (Fig.33D,G).

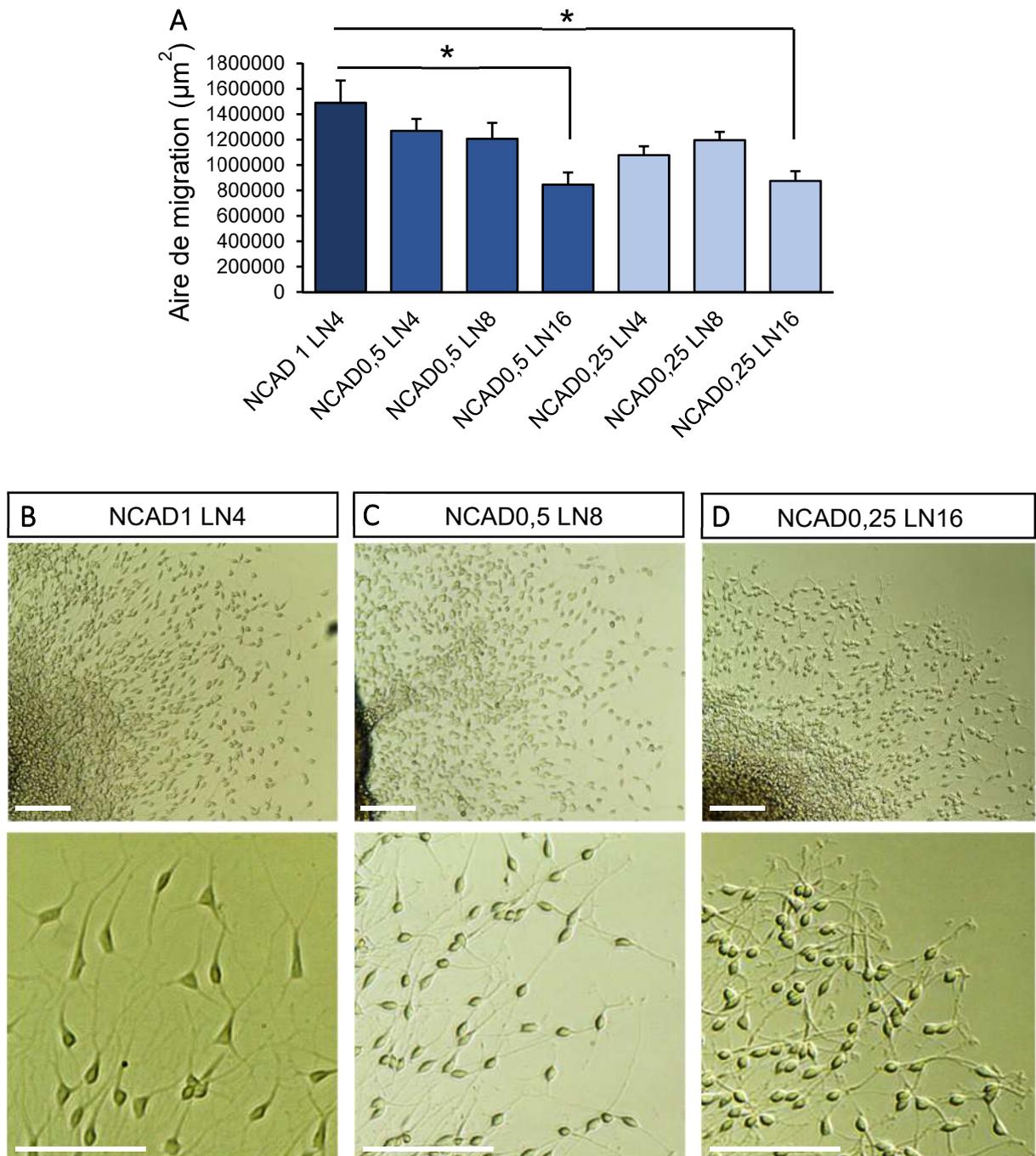
**Enfin, ces premières expériences nous ont permis de révéler : i) un effet général de la topographie promoteur de la migration comparé à une surface sans relief ; ii) des réponses cellulaires différentes en fonction de la géométrie de la topographie. Suite à ces expériences, nous nous sommes concentrés sur le relief de plots, où les cellules montrent une migration entretenue et physiologique.**

### 2.1.3 Test et choix du type de molécules d'adhésion

#### 2.1.3.1 Premiers tests de substrat mixte N-cadhérine et laminine sur du verre

*In vivo*, les cellules migrent en établissant des contacts adhésifs avec leur environnement. Ces contacts sont de deux types : les contacts avec des éléments de la matrice extracellulaire (laminine, fibronectine, collagène, etc.) qui engagent les récepteurs intégrines à la surface de la cellule, et les contacts avec d'autres cellules qui impliquent plutôt des récepteurs cadhérines. *In vitro*, le dépôt de molécules d'adhésion à la surface des supports de culture améliorent voire sont indispensables à l'attachement, la migration et/ou la survie cellulaire. Par ailleurs, les différentes molécules d'adhésion influencent la morphologie et le comportement dynamique des cellules en migration. Une étude du laboratoire montre ainsi qu'un substrat pur de N-cadhérine (exprimé sur le chemin de migration des interneurones) augmente la motilité mais diminue la directionnalité des interneurones en migration *in vitro*. En revanche, un substrat mixte N-cadhérine et laminine restaure la polarité et la directionnalité des cellules (Luccardini et al., 2013). Sur un substrat de laminine pure, les interneurones sont polarisés mais migrent plutôt en chaîne et sont peu motiles.

J'ai ainsi testé plusieurs combinaisons de différentes concentrations de N-cadhérine et de laminine, sur du verre pour commencer, afin de sélectionner la combinaison idéale de ces deux molécules (Figure 34). En accord avec les résultats précédemment publiés, les plus grandes distances de migration sont obtenues sur un substrat avec le plus de N-cadhérine (NCAD 1 $\mu$ g/lamelle) et le moins de laminine (LN 4 $\mu$ g/mL) (Figure 34A). Sur ce substrat, les cellules adoptent une morphologie « typique » avec un noyau allongé ou triangulaire, et de longs prolongements (Figure 34B). A quantité de NCAD fixe (0,5 ou 0,25 $\mu$ g/lamelle) l'augmentation de la concentration de LN (surtout à partir de 8 $\mu$ g/mL) diminue les distances de migration atteintes en 24h. Avec les plus faibles quantités de NCAD (0,25 $\mu$ g/lamelle) et les plus fortes de LN (16 $\mu$ g/mL), on observe des cellules plus courtes, unipolaires et peu individualisées. Avec des concentrations intermédiaires de ces deux molécules, on observe des cellules individualisées au front de migration, avec des morphologies physiologiques plus ou moins branchées, et de bonnes distances de migration (Figure 34A,B). **Nous avons donc finalement sélectionné la combinaison N-cadhérine 0,25 $\mu$ g/lamelle + laminine 8 $\mu$ g/mL (NCAD0,25LN8) pour le bon compromis qu'elle offre entre activation de la motilité et maintien de la polarité cellulaire.**



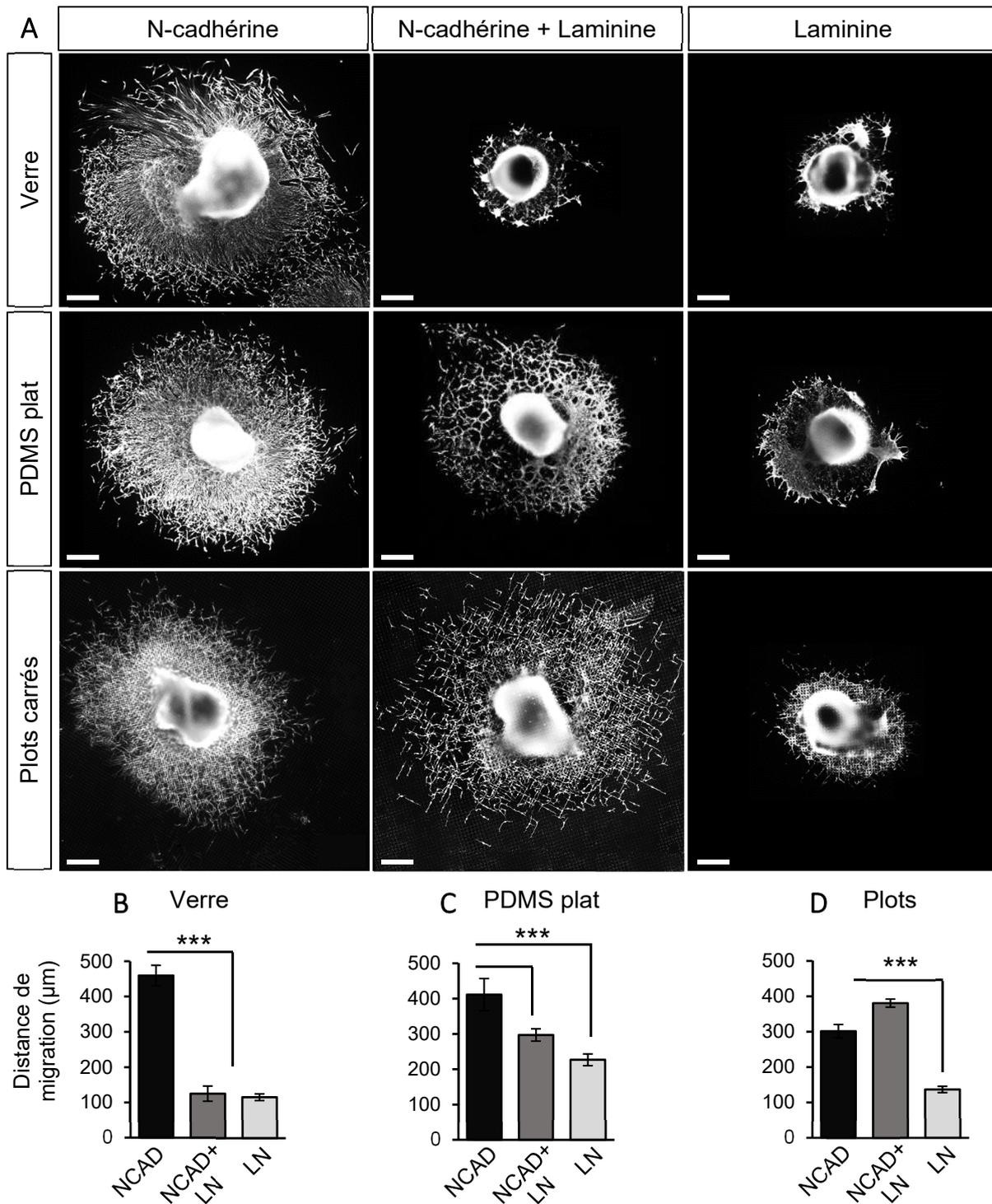
**Figure 34 | Influence des combinaisons de molécules d'adhésion sur la migration et la morphologie des interneurones**

(A) Mesure de l'aire de migration après 24h sur du verre fonctionnalisé avec différentes concentration de molécules d'adhésion N-cadhérine (NCAD) et laminine (LN). NCAD1LN4 n=12 explants, 1 culture. NCAD0,5LN4 n=24 explants, 1 culture. NCAD0,5LN8 n=17 explants, 1 culture. NCAD0,5LN16 n=12 explants, 1 culture. NCAD0,25LN4 n=35 explants, 1 culture. NCAD0,25LN8 n=29 explants, 1 culture. NCAD0,25LN16 n=12 explants, 1 culture. Test Anova, Tukey's post-test. (B-D) Interneurones en migration (contraste de phase) sur du verre fonctionnalisé avec (B) de la N-cadhérine 1µg/lamelle + laminine 4µg/mL (C) de la N-cadhérine 0,5µg/lamelle + laminine 8µg/mL (D) de la N-cadhérine 0,25µg/lamelle + laminine 16µg/mL. Echelles 10µm

### 2.1.3.2 Influence des molécules d'adhésion sur les substrats microstructurés

J'ai ensuite testé la migration des interneurons *in vitro* sur des surfaces de PDMS, planes ou microstructurées. Sur des surfaces sans topographie, en verre ou en PDMS, les distances maximales de migration sont atteintes sur un substrat pur de N-cadhérine et les plus faibles avec la laminine seule, comme rapporté précédemment (Fig.35A,B,C). De manière intéressante, sur une surface microstructurée de plots, c'est cette fois le substrat de N-cadhérine et laminine qui promeut les distances de migration les plus importantes (Fig.35A,D). Ce résultat suggère que le degré et le type d'adhésion des structures dans l'environnement extracellulaire peut moduler l'action du relief vers un effet positif ou négatif sur la migration.

Pour conclure, l'ensemble de ces expériences nous a permis de sélectionner un relief de plots recouverts d'un mélange de N-cadhérine et de laminine en faibles quantités pour la suite de l'étude. Ce substrat constitue un nouveau système expérimental où la migration est améliorée par rapport à des substrats classiques sans relief.



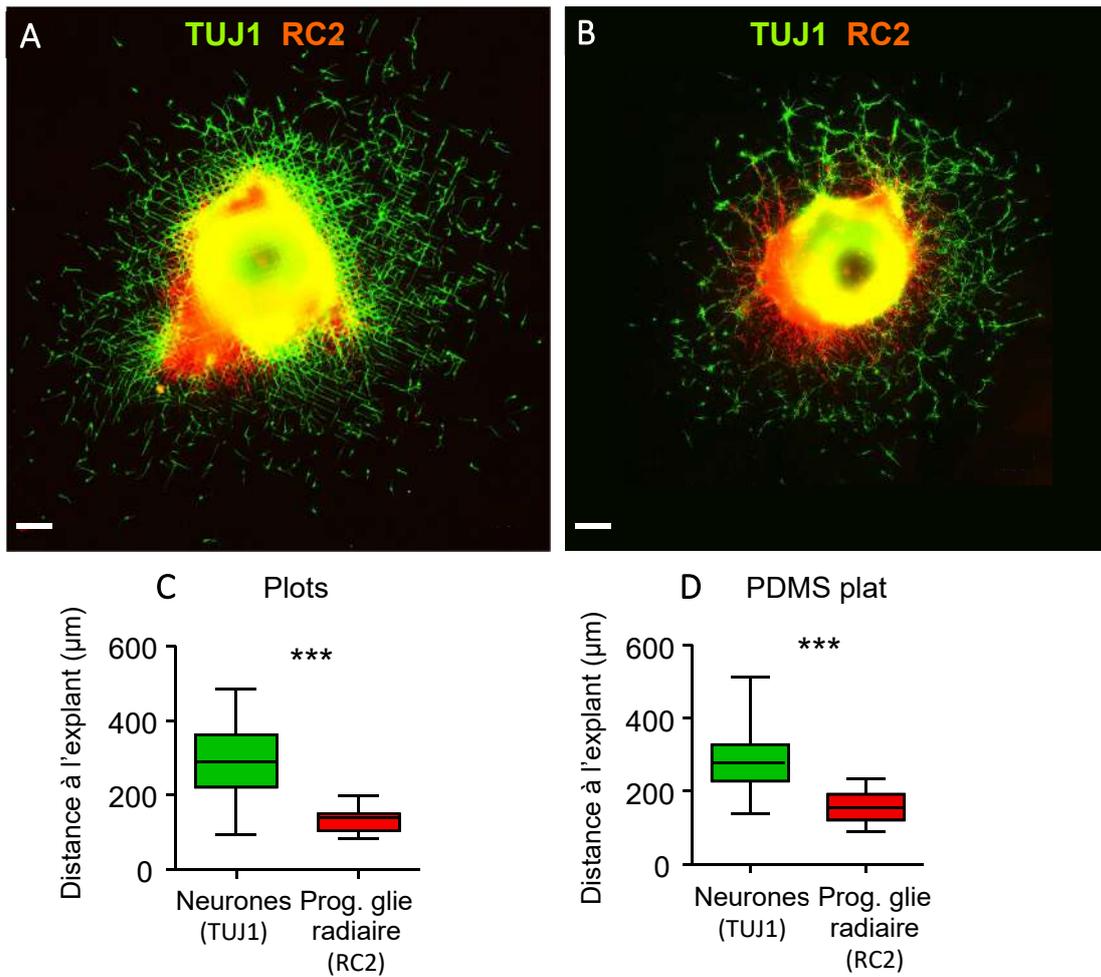
**Figure 35 | Influence des molécules d'adhésion et des différents substrats sur la migration des interneurones**

(A) Migration des interneurones hors de l'explant après 24h de culture sur différents substrats (verre, PDMS plat et plots carrés) et avec différentes molécules d'adhésion (N-cadhérine 1µg/lamelle, N-cadhérine 0,25µg/lamelle + laminine 8µg/mL, Laminine 20µg/mL). Echelles 200µm. (B-D) Mesure des distances de migration depuis l'explant après 24h de culture dans les différentes conditions. Verre : NCAD n=12 explants, 1 culture. NCAD+LN n=7 explants, 1 culture. LN n=18 explants, 2 cultures. PDMS plat : NCAD n=6 explants, 1 culture. NCAD+LN n=22 explants, 2 cultures. LN n=7 explants, 1 culture. Plots : NCAD n=12 explants, 1 culture. NCAD+LN n=29 explants, 20 cultures. LN n=12 explants, 1 culture. Test Anova, Tukey's post-test.

#### 2.1.4 Caractérisation cellulaire des cultures

L'éminence ganglionnaire médiane (EGM) mise en culture est la source de la majorité d'interneurones corticaux en migration vers le cortex. Cette structure est formée : d'une zone ventriculaire qui contient les progéniteurs de glie radiaire, d'une zone sous-ventriculaire qui contient les progéniteurs intermédiaires et une partie des interneurones nouvellement générés, et du manteau, au cœur de la structure d'où partent les interneurones en migration. En culture *in vitro*, chaque explant conserve une partie de toutes ces régions, et contient donc une population cellulaire mixte de neurones et progéniteurs.

Pour vérifier la nature des cellules en migration autour de l'explant, nous avons effectué des immunomarquages sur des explants fixés à 24h de culture contre TUJ1, marqueur spécifique des neurones, et RC2, qui marque les progéniteurs de glie radiaire (Fig.36A,B). L'immense majorité des cellules qui constituent la nappe de migration sont positifs pour TUJ1, indiquant que ces cellules sont bien des neurones (Fig.36A,B). Des fibres de glie radiaire sont visibles dans l'explant et à sa périphérie immédiate. La mesure des distances atteintes par ces fibres positives pour RC2 indique qu'elles restent confinées dans un rayon de 150 $\mu$ m autour de l'explant sur tous les types de substrat. A l'inverse des neurones positifs pour TUJ1 se retrouvent beaucoup plus loin (jusqu'à 400 $\mu$ m) (Fig.36C,D). Des marquages d'Olig2, un marqueur de précurseurs d'oligodendrocytes que l'on trouve aussi dans l'EGM, montrent également que ces cellules sont présentes, mais ne migrent pas hors de l'explant.



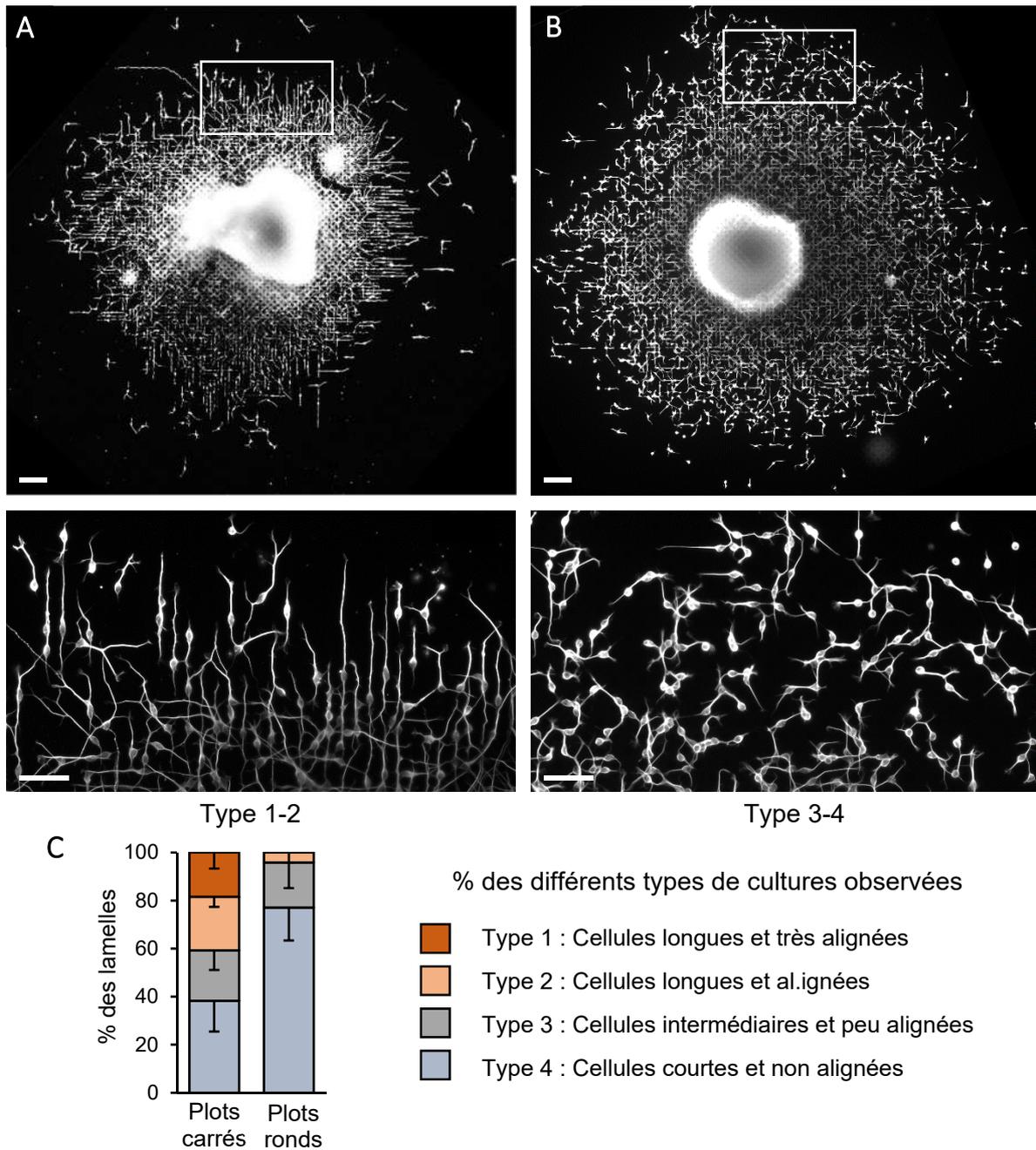
**Figure 36 | Caractérisation cellulaire des cultures**

(A,B) Immunomarquages contre TUJ1 (neurones) et RC2 (progéniteurs de glie radiaire) après 24h de culture sur des plots (A) ou PDMS plat (B). Echelles 100µm. Coating NCAD+LN (C,D) Mesures des distances à l'explant atteintes par les neurones ou les fibres de glie radiaire après 24h de culture, tous coating confondus. Plots : TUJ1 n=53 explants, 2 cultures. RC2 n=12 explants, 1 culture. Plat : TUJ1 n=35 explants, 2 cultures. RC2 n=9 explants, 2 cultures. T-test.

### 2.1.5 Organisation macroscopique et variabilité au sein des cultures

Sur les substrats de plots recouverts d'un mélange de N-cadhérine et de laminine, diverses catégories d'organisation de la « nappe » de migration autour de l'explant et de morphologies cellulaires sont observées et retrouvées dans les différentes cultures. En particulier, on peut observer des explants autour desquels s'organise un maillage régulier de longues cellules, parallèles et alignées au front de migration (Fig.37A, type 1-2). A l'opposé, certains explants montrent un ensemble de cellules courtes sans organisation particulière. Ces explants ont tendance à montrer une densité de cellules plus faible et les plus grandes distances de migration (Fig.37B, type 3-4). Au sein d'une même lamelle, les explants adoptent en général la même organisation, ce qui suggère qu'il ne s'agit pas d'une variabilité régionale au sein d'une EGM, mais plutôt d'une variabilité inter-lamelles qu'il est difficile de contrôler.

De manière intéressante, ce premier type de cultures dites « alignées » est uniquement visible dans un environnement de plots carrés (45% des explants) (Fig.37C). A l'inverse, elles ne sont observées que dans 5% des cultures sur des plots ronds. Dans cet environnement, une majorité de cultures aux cellules courtes et désorganisées sont obtenues (75%) (Fig.37C). **Cette observation suggère que les interneurones en migration sont sensibles à de faibles variations dans la géométrie de la topographie de leur microenvironnement, et nous a poussé à nous intéresser plus en détail aux comportements cellulaires dans ces deux types de topographie, étude qui constitue le cœur de mes travaux de thèse.**



**Figure 37 | Organisation macroscopique et variabilité des cultures**

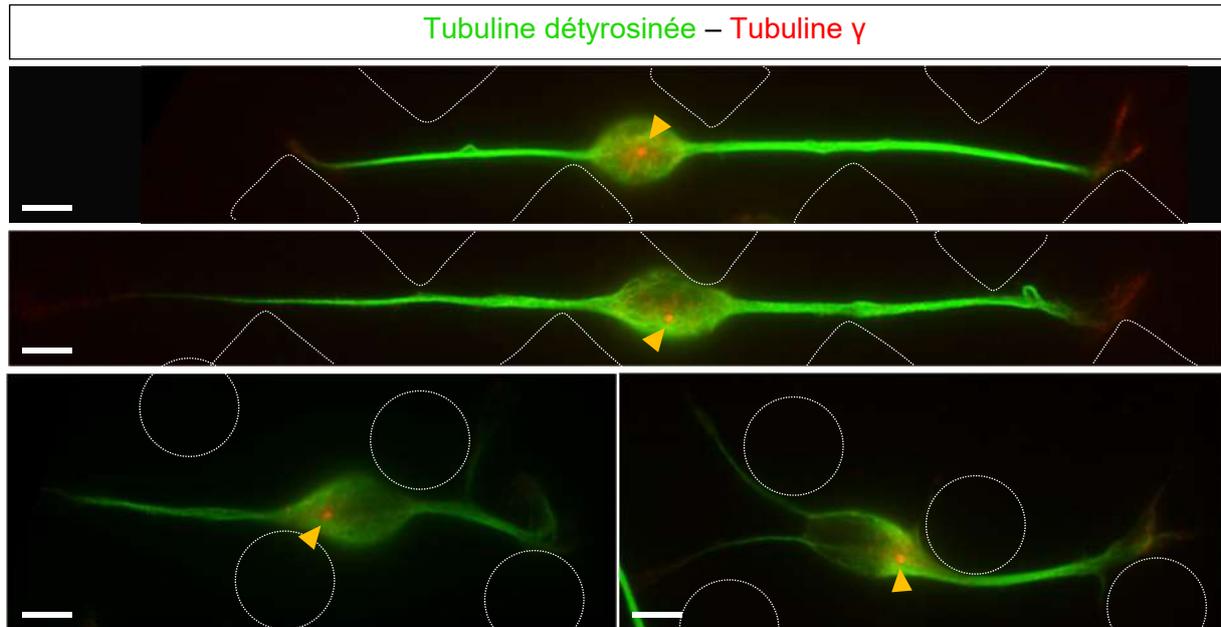
(A,B) Plusieurs types de cultures sont régulièrement observés au cours des différentes expériences dans les mêmes conditions. Haut échelle 100µm, bas échelle 50µm (A) Explants avec des cellules plutôt longues et à l'alignement visible. (B) Explants avec des cellules courtes sans alignement visible. (C) Moyennes des % des types de cultures sur l'ensemble des expériences effectuées. n=8 cultures. Test Chi2 indique une différence de \*\*\* (P<0,0001) entre plots carrés et plots ronds

## 2.2 Caractérisation intracellulaire approfondie des interneurones en migration sur les deux substrats de plots

### 2.2.1 Position du centrosome dans les interneurones en migration

Le centrosome est le principal centre organisateur des microtubules dans les cellules eucaryotes, et sa position est souvent reliée à la polarisation des cellules en migration. Dans ces cellules, il est classiquement observé à l'avant du noyau dans la direction du mouvement, bien que des dépassements du centrosome par le noyau aient également été décrits (Distel et al., 2010; Umeshima et al., 2007). Dans les interneurones en migration dans des co-cultures, le mouvement du noyau est souvent précédé de l'avancée du centrosome dans une dilatation cytoplasmique au niveau du prolongement de migration (Bellion et al., 2005).

Nous avons observé la position du centrosome dans les interneurones en migration sur les substrats microstructurés avec un marquage contre la tubuline  $\gamma$  localisé au centrosome (Figure 38). Dans l'immense majorité des interneurones de nos cultures, nous n'observons pas la formation d'une dilatation cytoplasmique et le centrosome reste localisé proche du noyau. Par ailleurs, le centrosome semble être autant positionné à l'avant qu'à l'arrière du noyau (Figure 38). Sur les longues cellules alignées sur la diagonale des carrés, le centrosome est souvent observé au centre du noyau, ce qui peut être relié à la présence d'un long processus arrière qui équilibre la position du centrosome au point d'émergence des deux faisceaux de microtubules.



**Figure 38 | Positionnement du centrosome dans les interneurons en migration**

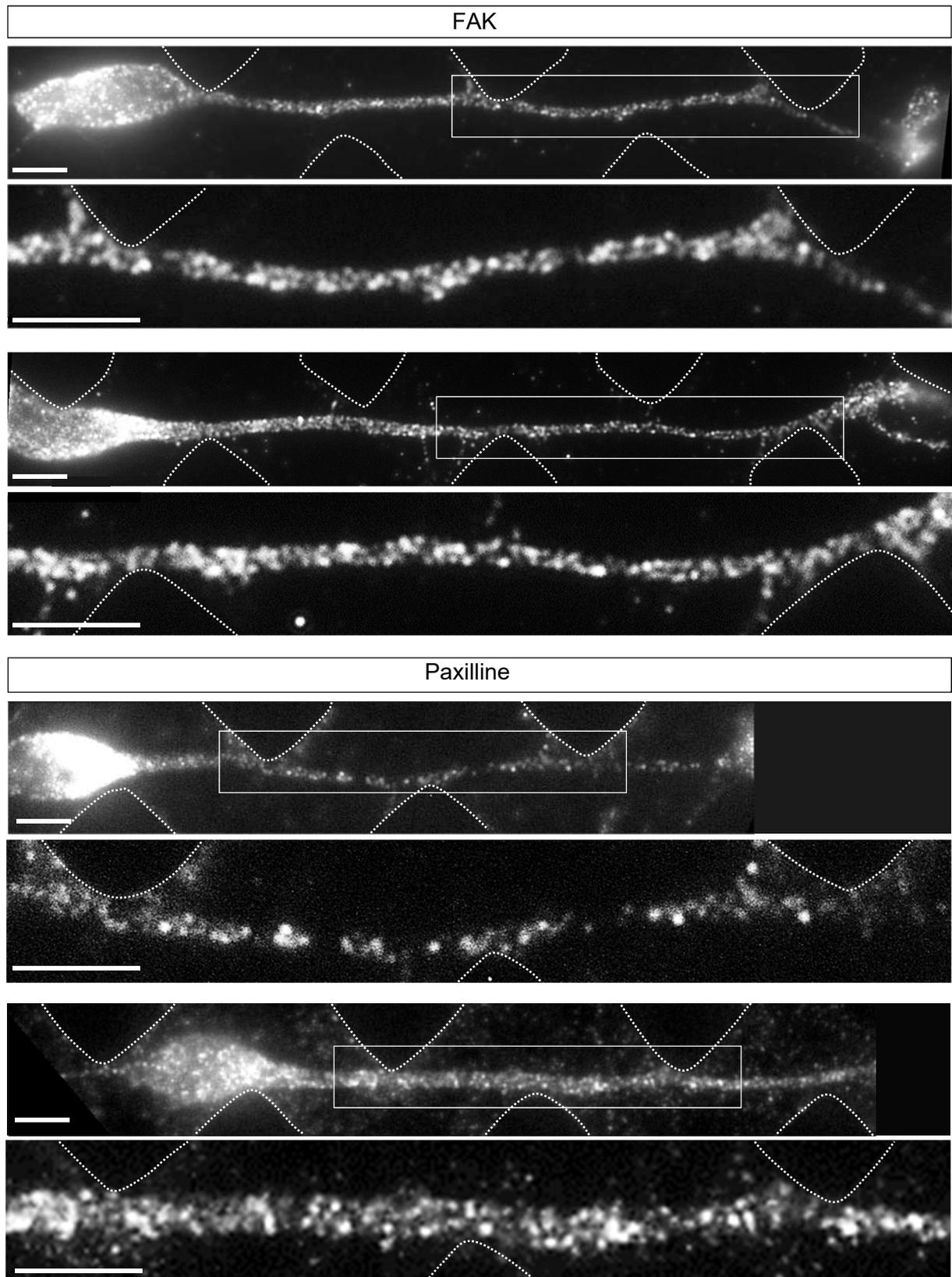
Immunomarquages contre la tubuline  $\gamma$  (enrichie au centrosome, en rouge) et les microtubules détyrosinés (microtubules stables, en vert) sur des interneurons fixés après 24h de migration entre plots carrés (haut) et plots ronds (bas). Les images représentent un seul plan d'acquisition. Echelles 5 $\mu$ m

### 2.2.2 Organisation des adhésions focales

L'établissement de complexes d'adhésion est indispensable pour la progression d'une cellule en mouvement, et ces derniers sont au cœur des mécanismes de détection des propriétés biophysiques du substrat. En particulier, les adhésions focales ont été impliquées dans la détection et la réponse à la topographie du microenvironnement. Nous avons observé la distribution des complexes d'adhésion dans les interneurons en migration sur nos substrats microstructurés en effectuant des marquages sur cellules fixées contre FAK et paxilline, deux protéines présentes au niveau des adhésions focales (Figure 39).

Des marquages ponctués dans l'ensemble de la cellule sont observés pour ces deux protéines. On observe en particulier des points de différentes tailles et intensités régulièrement distribués tout au long du prolongement de migration, au contact du substrat (Figure 39). Ces structures, compatibles avec des complexes d'adhésions, sont également nombreuses au niveau du corps cellulaire et du cône de croissance.

Nous avons observé en particulier les longues cellules alignées dans la direction diagonale des plots carrés dont le prolongement de migration montre des contacts préférentiels et répétés avec le coin des plots. Pour savoir si ces contacts impliquent l'établissement d'interactions adhésives, nous avons observé la distribution des adhésions focales au niveau de ces régions. Sur l'ensemble des cellules observées, aucune ne montre une accumulation d'adhésions au niveau des contacts avec les structures, et aucune différence dans la morphologie ou la distribution des complexes d'adhésion n'a pu être mise en évidence entre les cellules sur plots carrés et plots ronds (Figure 39). Des quantifications sont nécessaires pour conclure fermement mais ces premières observations semblent suggérer que les adhésions focales ne sont pas au cœur des différentes réponses cellulaires observées dans cette étude.

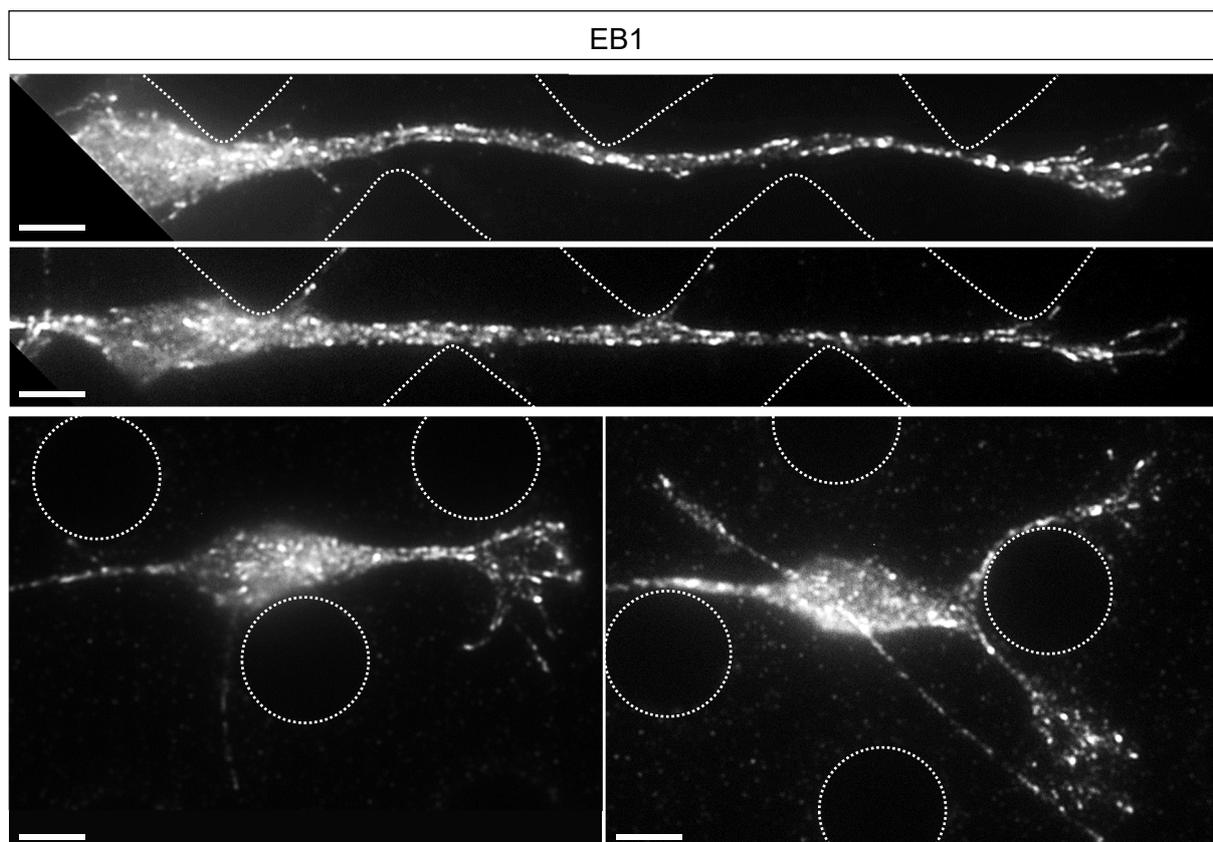


**Figure 39 | Adhésions focales dans les interneurons en migration entre des plots carrés**

Immunomarquages contre FAK (focal adhesion kinase) ou paxilline sur des interneurons fixés après 24h de migration entre plots carrés. Les images représentent un seul plan d'acquisition, au fond de la cellule au contact du substrat. Echelles 5 $\mu$ m

### 2.2.3 Organisation des comètes EB1

EB1 est une protéine qui s'associe avec les extrémités (+) en croissance des microtubules. Le marquage d'EB1 sur nos cultures permet de visualiser l'organisation des comètes dans les interneurons en migration (Figure 40). EB1 est visible dans tout le volume de la cellule, et particulièrement au niveau du cône de croissance et du prolongement de migration. Sur les longs prolongements des cellules alignées entre les plots carrés, on observe de longues comètes EB1 organisées de manière assez régulière les unes derrière les autres, laissant deviner deux faisceaux parallèles de microtubules (Figure 40). Ce marquage est cohérent avec l'organisation des microtubules décrite dans l'article, qui s'organisent en faisceaux longs et stables dans le prolongement de migration entre les plots carrés. Le marquage EB1 permet également de visualiser l'étendue du cône de croissance et nous confirme la présence d'un cône de croissance plutôt compact sur les plots carrés. A l'inverse, les courtes cellules entre les plots ronds montrent un cône de croissance beaucoup plus étalé et des comètes EB1 plus désorganisées en particulier au niveau du prolongement de migration (Figure 40). Ces résultats appuient donc l'organisation spécifique des microtubules observée entre les différentes morphologies cellulaires décrites dans les deux types de topographie.

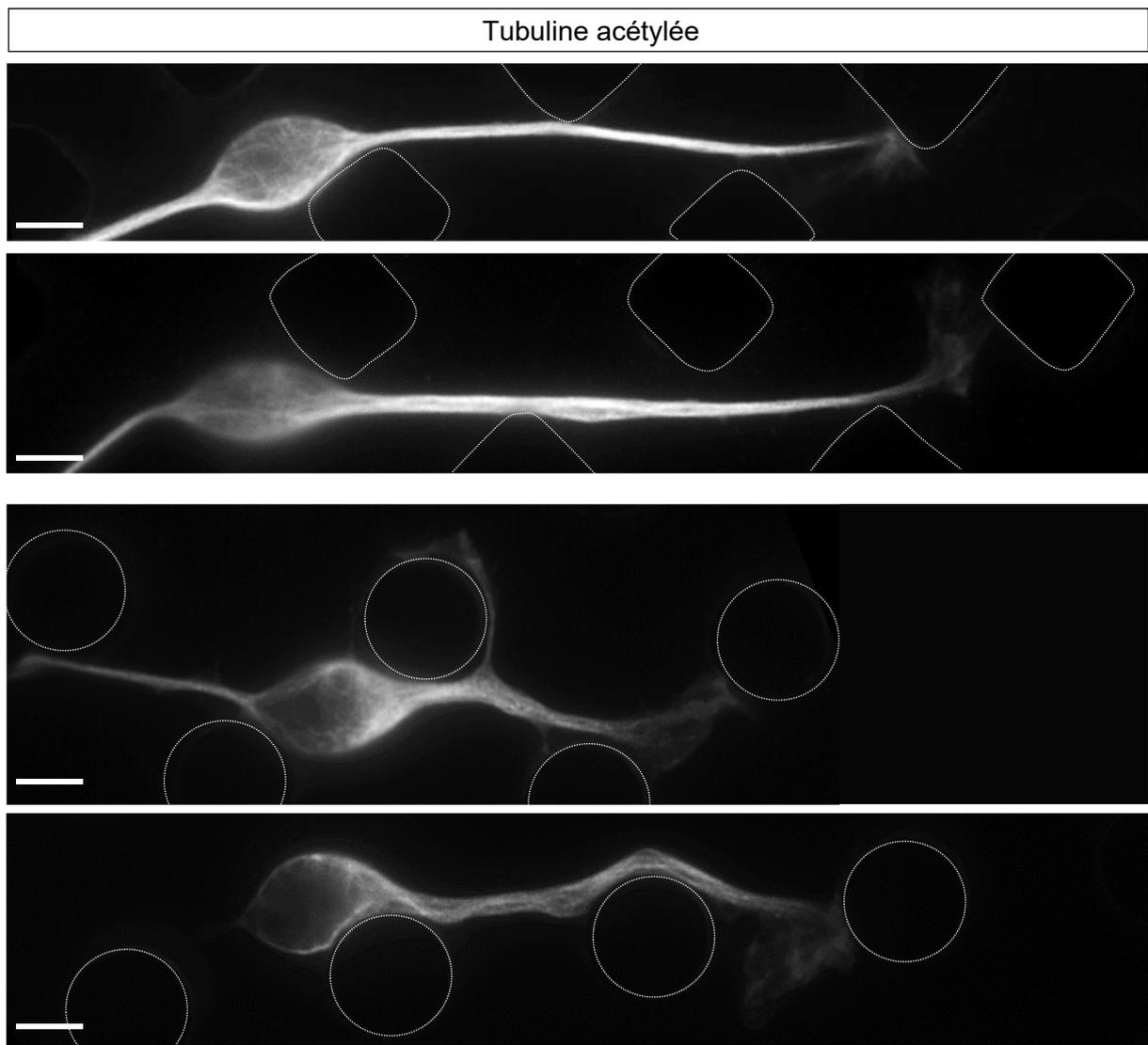


**Figure 40 | Distribution des comètes EB1 dans les interneurons en migration**

Immunomarquages contre EB1 (extrémités (+) des microtubules) sur des interneurons fixés après 24h de migration entre plots carrés (haut) et plots ronds (bas). Les images représentent un seul plan d'acquisition. Echelles 5µm

## 2.2.4 Organisation de la tubuline acétylée

L'acétylation de la Lys40 sur la tubuline  $\alpha$  est une modification post-translationnelle associée à une stabilisation des microtubules (Janke and Bulinski, 2011). Le marquage de la tubuline acétylée dans les interneurons en migration, bien qu'un peu moins démonstratif, permet de confirmer les résultats obtenus par marquage de la tubuline détyrosinée, une autre modification associée aux microtubules stables (Figure 41). Ainsi, on retrouve dans les cellules alignées entre les plots carrés un long prolongement de migration formé de faisceaux denses et stables. A l'inverse, les cellules entre les plots ronds montrent des faisceaux de microtubules moins denses et organisés (Figure 41).



**Figure 41 | Organisation de la tubuline acétylée dans les interneurons en migration**

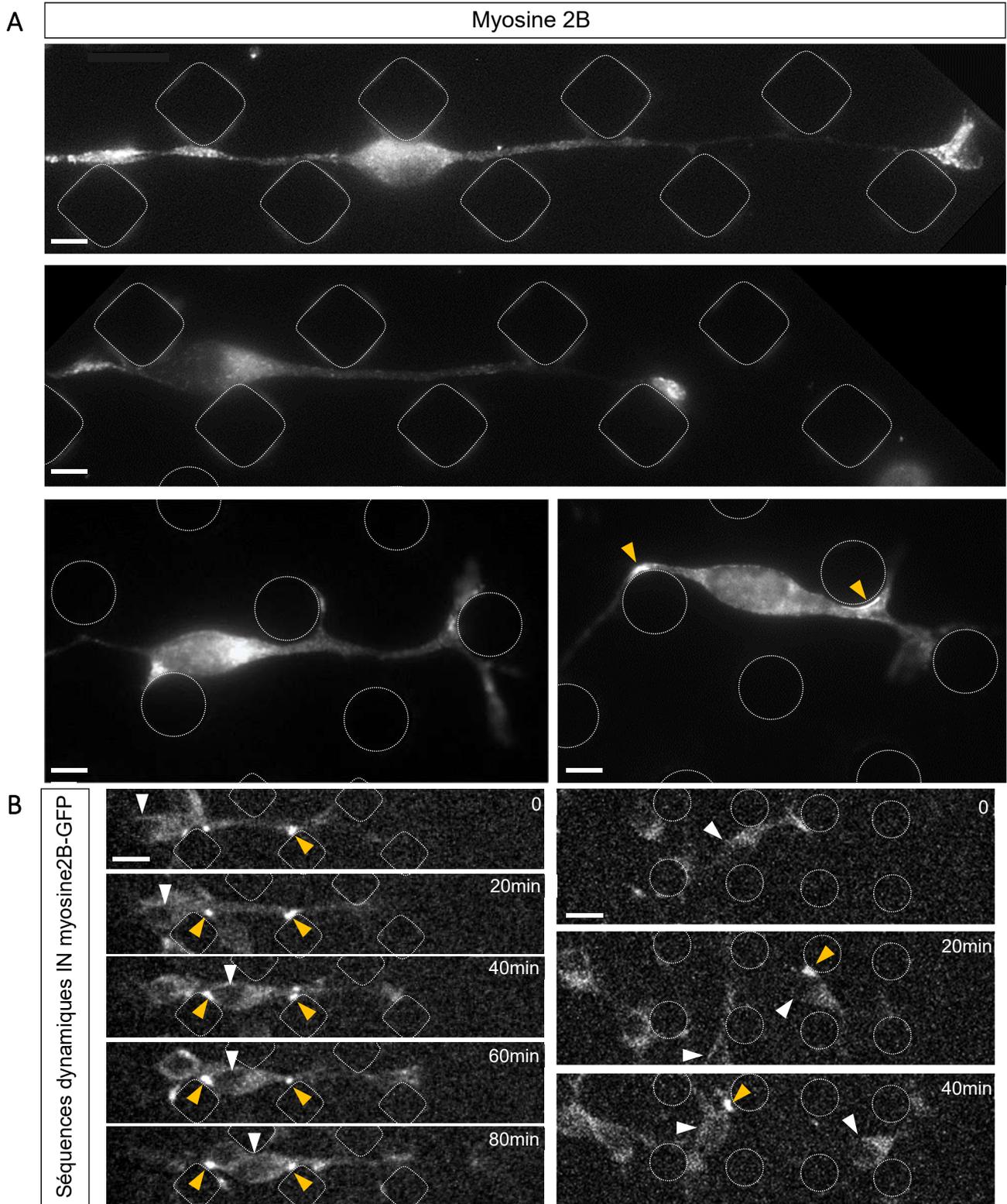
Immunomarquages contre la tubuline acétylée (microtubules stables) sur des interneurons fixés après 24h de migration entre plots carrés (haut) et plots ronds (bas). Les images représentent un seul plan d'acquisition. Echelles 5 $\mu$ m

### 2.2.5 Organisation de la myosine II B

Les myosines II A et B sont les deux types principaux de myosine II exprimés dans les neurones en migration. Dans les interneurones, la myosine II s'accumule au niveau du cône de croissance, et à l'arrière du noyau où elle joue un rôle dans la nucléokinèse (Bellion et al., 2005; Godin et al., 2012; Martini and Valdeolmillos, 2010; Schaar and McConnell, 2005). Nous avons utilisé des embryons de souris Myosine2B-GFP pour visualiser la distribution de cette protéine dans les interneurones en migration entre les plots, sur cellules fixées ou vivantes par des enregistrements en vidéomicroscopie.

Comme décrit précédemment, nous avons observé des accumulations de myosine2B au cône de croissance et ponctuellement à l'arrière du noyau (Figure 42A). En particulier, nous avons pu constater que les accumulations les plus fortes précèdent la rétraction des processus arrière ou des prolongements de migration à l'avant, ce qui confirme l'activité contractile de la myosine II, conduisant au détachement de structures adhésives.

Par ailleurs, un petit nombre de cellules montre des accumulations de myosine II B au niveau du prolongement de migration ou du noyau, au contact des plots (ronds ou carrés) (Figure 42B). Ces accumulations peuvent être ponctuelles (exemple de la cellule entre plots ronds), ou plus durables, formant ainsi des points fixes sur lesquels la cellule avance (exemple de la cellule sur plots carrés). La fonction de ces points contractiles n'a pas pu être explorée plus en avant, mais ils pourraient constituer une première piste dans l'étude des mécanismes impliqués dans la détection et la réponse à la topographie dans notre système.



**Figure 42 | Distribution de la myosine2B dans les interneurones en migration**

(A) Interneurones d'embryons Myosine2B-GFP fixés après 24h de culture entre plots carrés et ronds. Echelles 5µm. (B) Séquences dynamiques extraites d'enregistrement d'interneurones Myosine2B-GFP en migration entre plots carrés et ronds. Echelles 10µm. Intervalle entre deux images : 20 minutes. Les flèches blanches indiquent la position du corps cellulaire et les flèches jaunes les accumulations ponctuelles de myosine2B au contact des plots.



### III. Discussion



---

# Discussion

---

## Sommaire

---

1. Les approches biophysiques pour l'étude de la migration des interneurones corticaux
  - 1.1 Intérêt des approches *in vitro* réductionnistes
  - 1.2 Développement d'un nouveau système expérimental pour l'étude de la migration des interneurones *in vitro*
2. Caractérisation de différentes morphologies d'interneurones
  - 2.1 La topographie sélectionne une partie du large spectre morphologique intrinsèque des interneurones
  - 2.2 Ces différents états cellulaires sont caractérisés par une combinaison de paramètres morphologiques liés
    - 2.2.1 Critères morphologiques
    - 2.2.2 Influence réciproque de l'organisation morphologique sur la dynamique de branchement
3. Mise en évidence de différents comportements dynamiques
  - 3.1 Lien entre morphologie et mode de migration
  - 3.2 Le prolongement de migration, acteur de la migration neuronale
4. Le guidage par contact des interneurones corticaux
  - 4.1 Un alignement remarquable entre les plots carrés
  - 4.2 Modèle de la mise en place des différents états cellulaires observés
  - 4.3 Mécanismes intracellulaires et moléculaires impliqués
  - 4.4 La topographie : guide ou obstacle ?
5. Implication de ces résultats dans un cadre physiologique
  - 5.1 Comportements dynamiques et stratégies de migration *in vitro* et *in vivo*
  - 5.2 Influence des paramètres physiques de l'environnement *in vivo* ?

## Conclusion

---

---

# 1 Les approches biophysiques pour l'étude de la migration des interneurons corticaux

---

## 1.1 Intérêt des approches *in vitro* réductionnistes

Les questions de biologie cellulaire, dans lesquelles la cellule est au cœur du champ d'investigation, ont toujours combiné des approches *in vivo* et *in vitro*. Si les approches *in vivo* analysent les comportements cellulaires physiologiques de manière intégrée, les approches *in vitro* permettent d'accéder aux mécanismes fondamentaux du fonctionnement de la cellule, et de s'affranchir de conditions externes complexes parfois difficiles à maîtriser. Néanmoins, les cultures cellulaires *in vitro* consistent souvent à placer les cellules sur une lamelle de verre ou une surface de plastique, planes et rigides, des conditions très éloignées de ce que peut expérimenter la cellule dans son environnement naturel. Ce type de conditions expérimentales peut conduire à des comportements cellulaires aberrants et peut amener à questionner la validité de ces approches.

Depuis une vingtaine d'années, le développement d'outils et de techniques issus de la microélectronique ont permis de combler une partie du fossé entre les approches *in vitro* et *in vivo*. Cet ensemble de techniques, très variées, peuvent être regroupées sous le terme de microfabrication et permettent de construire des micro-environnements biologiques synthétiques aux propriétés parfaitement contrôlées. Ce type d'approches présente l'immense avantage de complexifier l'environnement des systèmes classiques de culture, et donc de se rapprocher de conditions physiologiques, tout en contrôlant très précisément les propriétés physiques et chimiques de l'environnement. Dans ces systèmes, on peut ainsi accéder à des comportements cellulaires fondamentaux et tester de manière non ambiguë l'influence de paramètres uniques sur ces comportements. Ces techniques de microfabrication (microfluidique, micropatterning, etc.) venues de la physique se démocratisent chez les biologistes. Ces approches interdisciplinaires sont aujourd'hui au cœur d'avancées majeures dans le domaine de la biologie cellulaire, et de la migration cellulaire en particulier, et ont permis notamment de mettre en évidence la grande influence d'un certain nombre de facteurs physiques et mécaniques dans ces processus.

## 1.2 Développement d'un nouveau système expérimental pour l'étude de la migration des interneurones *in vitro*

La migration des interneurones corticaux au cours du développement embryonnaire a historiquement été découverte puis décrite dans leur environnement physiologique, dans l'embryon ou dans des tranches de cerveau (De Carlos et al., 1996; Polleux et al., 2002; Tamamaki et al., 1997; Tanaka et al., 2003). Des approches *in vitro* ont ensuite été développées pour analyser de manière plus reproductible et quantitative les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans cette migration. En particulier, des co-cultures où les interneurones migrent de manière soutenue sur un substrat plat de cellules corticales dissociées, constituent un système intéressant grâce auquel le cycle de mouvement des interneurones a pu être décrit et analysé (Bellion et al., 2005). Les explants d'EGM peuvent également être cultivés dans des matrices 3D de type Matrigel (Flames et al., 2004; López-Bendito et al., 2008; Pozas and Ibáñez, 2005; Sánchez-Alcañiz et al., 2011; Zhu et al., 1999b). Dans ces systèmes, les propriétés physiques et biochimiques de l'environnement restent néanmoins très partiellement connues et contrôlées, ce qui peut amener de la variabilité dans les réponses cellulaires et rendre une partie des résultats obtenus difficile à interpréter. A l'inverse, de simples lamelles de verre recouvertes de molécules d'adhésion constituent un environnement trop minimaliste sur lequel une faible migration des interneurones et des comportements non physiologiques sont souvent observés.

Le nouveau système expérimental que j'ai développé pendant ma thèse constitue un intermédiaire intéressant entre les différents systèmes décrits précédemment. L'utilisation d'un substrat microstructuré, plus proche de l'environnement 3D physiologique qu'une simple lamelle de verre, permet pour commencer d'améliorer la migration des interneurones : les cellules restent individualisées (ce qui permet une meilleure visualisation des processus cellulaires) et se déplacent sur de plus longues distances en adoptant des morphologies et des comportements physiologiques. D'un point de vue technique, ce support de migration constitue donc un système *in vitro* optimisé et amélioré par rapport à d'autres systèmes existants déjà. D'un point de vue plus biologique, la modulation contrôlée de la géométrie de la topographie du substrat permet ensuite d'en étudier spécifiquement l'influence sur la migration des interneurones corticaux au cours du développement embryonnaire.

Grâce à ce nouveau système expérimental, j'ai pu démontrer pour la première fois l'existence du guidage par contact chez les interneurones. Ces travaux exploratoires ouvrent deux axes majeurs d'étude. Le premier est de comprendre plus en avant les mécanismes sous-jacents à ce guidage par contact, ainsi que ses implications dans le cadre physiologique de la migration neuronale pendant le développement du cerveau. Le second, plus méthodologique, est d'inverser l'approche « top-down » réductionniste adoptée ici et de reprendre une stratégie « bottom-up » pour reconstruire bloc par bloc

la complexité de l'environnement physiologique à partir de ce système expérimental simplifié. Quelques pistes intéressantes pourraient être de combiner la topographie avec des signaux de guidage diffusibles, d'inclure des substrats cellulaires d'architecture contrôlée ou de reproduire des variations de topographie observées *in vivo* par exemple.

En utilisant des substrats de plots micrométriques, carrés ou ronds, nous avons pu démontrer la sensibilité des interneurones en migration à la topographie de leur environnement et à sa géométrie. En particulier, nous avons pu mettre en évidence dans ces deux environnements des réponses cellulaires morphologiques et dynamiques très différentes. L'environnement minimaliste que nous avons développé, dans lequel les interneurones reçoivent un minimum de facteurs de guidage extracellulaires, nous permet également d'accéder aux propriétés et comportements intrinsèques de ces cellules. **Mes travaux de thèse apportent donc de nouvelles connaissances sur ces deux aspects dont nous allons maintenant discuter : la biologie cellulaire fondamentale de ces cellules et l'influence d'un facteur externe physique, la topographie, sur ces comportements intrinsèques.**

---

## 2 Caractérisation de différentes morphologies d'interneurones

---

### 2.1 La topographie sélectionne une partie du large spectre morphologique intrinsèque des interneurones

L'approche réductionniste que nous avons adoptée pour cette étude nous offre l'avantage de séparer les propriétés et les comportements cellulaires intrinsèques de l'influence des facteurs externes. La condition PDMS plat sans topographie constitue l'environnement a priori le plus minimal (à l'exception des molécules d'adhésion à sa surface et des éventuels facteurs sécrétés par l'explant) dans lequel les comportements cellulaires intrinsèques peuvent être observés. Il est intéressant de constater qu'à la sortie de l'explant, les interneurones présentent une polarisation spontanée visible par la morphologie cellulaire (un long prolongement de migration qui s'étend depuis le corps cellulaire) et la direction de migration, radiale hors de l'explant. Même s'il n'est pas exclu que cette polarisation soit liée à un facteur diffusible en provenance de l'explant, un programme interne semble conférer spontanément aux interneurones leur phénotype migratoire.

Dans nos cultures *in vitro* fixées, les interneurones montrent une grande diversité de morphologies. Cette morphologie est classiquement décrite et quantifiée par son paramètre le plus visible et caractéristique : le degré de branchement du prolongement de migration. On observe ainsi sur un substrat plat 60% de cellules non branchées, 20% avec une bifurcation le long du prolongement de migration et 20% avec au moins 2 bifurcations. Ces proportions sont cohérentes avec celles observées dans un environnement physiologique (Baudoin et al., 2012; Tanaka et al., 2009) et montrent que cette diversité morphologique présente *in vivo* est le reflet d'une grande plasticité intrinsèque de ces cellules. De manière intéressante, la proportion de ces différentes morphologies est modifiée dans des environnements microstructurés de plots ronds ou carrés. En particulier, deux morphotypes différents sont ségrégués : des cellules longues et peu branchées qui s'alignent entre les plots carrés dans leur direction diagonale, et des cellules courtes et branchées entre les plots ronds. **Cette observation indique que la topographie, plutôt que de complexifier un phénotype intrinsèque unique, sélectionne et stabilise une partie du large spectre d'états cellulaires que les interneurones peuvent adopter de manière autonome.** Par ailleurs, l'observation de morphologies intermédiaires entre ces deux morphotypes extrêmes nous a amené à rejeter l'hypothèse de l'existence de plusieurs populations, chacune associée à un morphotype, et à privilégier l'hypothèse d'une population cellulaire unique plastique.

## 2.2 Ces différents états cellulaires sont caractérisés par une combinaison de paramètres morphologiques liés

### 2.2.1 Critères morphologiques

Outre le nombre de branches, la morphologie des interneurones en migration peut être caractérisée par plusieurs autres paramètres : la longueur et la largeur du prolongement de migration principal, la forme du noyau et la longueur du processus arrière par exemple. L'obtention reproductible de deux morphotypes différents entre plots carrés et ronds nous a permis d'en analyser plus précisément les différents paramètres morphologiques. **De manière intéressante, la combinaison de ces différents paramètres n'est pas aléatoire, et chaque morphotype est associé à une combinaison stéréotypée de caractères morphologiques liés.** Ainsi, nous avons pu montrer que les longues cellules alignées entre les plots carrés ont tendance à avoir peu de branches, mais également un prolongement de migration fin, un noyau allongé et un long processus arrière. A l'inverse, les cellules courtes entre les plots ronds présentent plus de branches, un prolongement de migration plus épais, un noyau arrondi et un prolongement arrière court. Malgré la grande diversité des formes de cônes de croissance observés à l'avant du prolongement de migration, liée à leur remodelage presque constant, nous avons également

noté une tendance vers un cône de croissance plus compact sur les longues cellules non branchées et plus étalé sur les courtes cellules branchées. Ces différentes morphologies sont associées à une organisation particulière du cytosquelette de microtubules. Dans les longues cellules, le réseau de microtubule est aligné dans l'axe d'élongation. En particulier, les microtubules dynamiques (tyrosinés) s'étendent depuis le prolongement de migration jusqu'au prolongement arrière et forment un rail sur lequel est posé le noyau. Dans le prolongement de migration, les microtubules s'organisent en faisceaux denses et stables, comme le montre l'importante détyrosination dans cette région. A l'inverse, les microtubules apparaissent plus désorganisés dans les cellules courtes, dispersés et moins stables dans le prolongement de migration. Si ces éléments morphologiques et structuraux apparaissent liés, leur hiérarchie et la séquence d'évènements menant aux différents états cellulaires restent hypothétiques : la mise en place d'un de ces éléments déclenche-t-il mécaniquement tous les autres, ou s'établissent-ils de manière concomitante sous l'influence de l'environnement extracellulaire ? La perturbation spécifique de ces différents éléments pourrait permettre de répondre en partie à ces questions.

## 2.2.2 Influence réciproque de l'organisation morphologique sur la dynamique de branchement

Il est intéressant de constater que dans notre système, le nombre de branches semble associé à la longueur du prolongement de migration. Une analyse dynamique du branchement a montré que la diminution du nombre de branches sur les longues cellules entre les plots carrés n'est pas liée à un défaut de stabilisation des branches (leur temps de vie moyen est inchangé) mais plutôt à une diminution de la division du cône de croissance, comme le montre la fréquence de branchement plus faible dans cette condition. Par ailleurs, ces cellules forment des branches par une division asymétrique du cône de croissance principal, duquel un filopode latéral peut s'individualiser et s'allonger pour former une fine branche, généralement peu active et rapidement rétractée. A l'inverse, les cellules courtes entre les plots ronds forment des branches équivalentes par division symétrique du cône de croissance. Ces modes de formation de branches différentiels peuvent être reliés à l'organisation des microtubules dans le prolongement de migration et à la morphologie du cône de croissance. En effet, on peut penser que les microtubules stables en faisceaux serrés dans les longs prolongements de migration rendent difficiles l'étalement et la dispersion du cône de croissance à l'avant et diminuent sa fréquence de division. A l'inverse, le cône de croissance étalé qui prolonge les faisceaux dynamiques et dispersés dans les prolongements larges et courts est plus à même de se séparer en deux branches équivalentes. On pourrait ainsi imaginer une boucle de rétroaction négative où l'allongement progressif du prolongement de migration entraîne son affinement, son renforcement et sa stabilisation tout en diminuant sa probabilité de se diviser ou se fragmenter pour former des branches.

Cette hypothèse est notamment confortée par l'analyse de la migration d'interneurones mutants pour Doublecortine (DCX), une protéine associée à la stabilisation des microtubules, qui montre que ces cellules augmentent leur fréquence de branchement (Kappeler et al., 2006). De la même manière, des interneurones invalidés pour Rac1 et Rac3 montrent de courts prolongements branchés, associés à une diminution de l'acétylation des microtubules (marqueur de stabilité). Un traitement au taxol, qui stabilise les microtubules, restaure partiellement ce phénotype et allonge le prolongement tout en diminuant le nombre de branches (Tivodar et al., 2015).

De manière remarquable, il a été montré qu'une tension appliquée à des axones en croissance par leur attachement à des nanotubes de carbone provoque la rétraction des branches secondaires le long de l'axone (Anava et al., 2009). Il est intéressant de relier cette observation aux résultats que nous avons obtenus. En effet, même si aucune mesure de tension n'a été effectuée dans cette étude, la structure du prolongement de migration entre les plots carrés, long, fin et rectiligne ainsi que l'allongement du noyau suggère une tension cellulaire plus importante dans cette configuration qui pourrait en partie expliquer le faible nombre de branches formées. On peut également établir des parallèles avec la migration radiale des neurones excitateurs du cortex, qui passent d'un stade multipolaire où les neurones étendent et rétractent de multiples branches, à une migration unipolaire le long de la glie radiaire. Si les mécanismes qui conduisent à la suppression de branches latérales restent inconnus, il a été suggéré que l'établissement d'adhésions avec la glie radiaire à l'avant de la cellule, ou son attachement à la surface piaie aux derniers stades de translocation somale (qui met la cellule sous tension) pourraient jouer un rôle dans ce processus (Cooper, 2013).

---

## 3 Mise en évidence de différents comportements dynamiques

---

### 3.1 Lien entre morphologie et mode de migration

Le branchement du prolongement de migration est un processus dynamique et cyclique, et les interneurones alternent entre des phases de branchement et des phases de mouvement du noyau pendant leur cycle de mouvement. La formation de branches, et en particulier de branches divergentes par rapport à la direction du prolongement principal, est associée à des changements de direction de

migration (Martini et al., 2009). L'idée d'un lien fort entre morphologie et comportement dynamique apparaît ainsi assez intuitive, mais n'a finalement toujours été que suggérée indirectement dans la littérature. Notre système expérimental, où deux morphologies extrêmes du spectre peuvent être isolées, permet pour la première fois de répondre plus directement à cette question.

Entre les plots carrés, où une majorité d'interneurones possède un long prolongement non branché, les cellules montrent des trajectoires et un mouvement directionnel, comme l'illustre le ratio de persistance de direction plus proche de 1 dans cet environnement. A l'inverse, les cellules entre plots ronds, majoritairement courtes et branchées, dessinent des trajectoires plus courbées avec de nombreuses réorientations (toujours liées à un épisode de branchement). Ces résultats confirment et prouvent l'influence du degré de branchement des interneurones sur la directionnalité de leur mouvement. Nous avons également observé que les petites cellules branchées entre plots ronds sont plus motiles que les cellules directionnelles entre plots carrés, qui montrent une plus faible vitesse de déplacement du corps cellulaire. Ce résultat va à l'encontre de l'étude de Lysko et al., dans laquelle des interneurones au phénotype branché montrent des vitesses de translocations réduites (Lysko et al., 2011). Par ailleurs, une autre étude de Maiuri et al. montre une corrélation générale entre la persistance et la vitesse de migration pour un grand nombre de lignées cellulaires (Maiuri et al., 2015). Dans notre système, nos résultats de motilité cellulaire peuvent être reliés à l'interaction du corps cellulaire avec les micro-structures. En effet, nous avons pu montrer que le corps cellulaire des interneurones engagés sur la diagonale des plots carrés est souvent retenu à l'arrière entre deux plots, ce qui peut expliquer ses faibles vitesses de déplacement. Les corps cellulaires entre plots ronds sont moins contraints spatialement et établissent plutôt des contacts avec une structure à la fois, ce qui peut expliquer leur motilité accrue. Il est intéressant de noter que dans tous les cas, le noyau est presque toujours en contact avec au moins un plot, ce qui suggère qu'il cherche à maximiser sa surface d'adhésion, comme cela a été décrit pour d'autres neurones placés dans des topographies similaires (Hanson et al., 2009).

### 3.2 Le prolongement de migration, acteur de la migration neuronale

De manière générale, les neurones en migration sont composés de deux structures motiles : le cône de croissance à l'avant et le noyau à l'arrière, reliés par le prolongement de migration. Le cône de croissance est l'organe de guidage de la cellule, qui explore l'environnement de manière très dynamique et dont le mouvement et l'orientation déterminent largement la direction globale de migration. Le noyau, plus volumineux, semble suivre la direction imposée à l'avant. Pour comprendre plus précisément les processus cellulaires qui sous-tendent le mouvement directionnel observé entre les

plots carrés, nous avons observé et analysé plus précisément les évènements qui ont lieu à l'avant de la cellule. Les cônes de croissance observés par microscopie électronique montrent entre les plots carrés des morphologies et des orientations très variables, et interagissent avec toute la surface des plots de manière non spécifique, traduisant une dynamique exploratoire de mouvement a priori aléatoire. De manière surprenante, la base du cône de croissance (soit l'extrémité du prolongement de migration) suivie sur des séquences de mouvement dynamique montre un mouvement très régulier et directionnel en suivant les coins successifs des plots carrés, selon la même direction que le prolongement de migration. Dans cette configuration, ce n'est donc pas le mouvement de l'avant de la cellule qui dicte le comportement du prolongement de migration, comme classiquement décrit, mais à l'inverse c'est l'orientation du prolongement qui contraint le mouvement de l'avant. Le noyau, en arrière, suit dans la direction du prolongement de migration. **Il apparaît donc que l'orientation et probablement la stabilité et la rigidité du prolongement de migration peuvent largement déterminer la direction globale du mouvement.** Cette idée, peu explorée dans le domaine de la migration neuronale, replace cette structure au cœur des processus de mouvement cellulaire et remet en perspective l'influence du cône de croissance.

---

## 4 Le guidage par contact des interneurones corticaux

---

### 4.1 Un alignement remarquable entre les plots carrés

Un certain nombre d'explants d'EGM cultivés sur des plots carrés organisent de manière reproductible une « nappe » de migration qui forme un maillage orthogonal, et où les longues cellules au front de migration s'alignent selon deux directions préférentielles perpendiculaires. De manière surprenante au premier abord, les interneurones ne se déplacent pas dans les lignes vides entre les rangées de plots, mais s'engagent et s'alignent à 45° selon la direction diagonale des plots carrés (voir Figure 43). Cet alignement semble être spécifique à cette géométrie de plots (carrés, 10µm de côtés, 10µm d'écartement), et dépendre à la fois de la forme et de la distribution des structures. En effet, les plots carrés remplacés par des plots ronds (10µm de diamètre, 10µm d'écartement) abolissent l'alignement des interneurones qui s'orientent alors dans toutes les directions entre les plots. Ces résultats indiquent que la forme des plots contrôle en partie cet alignement. Néanmoins, l'espace entre les structures est légèrement augmenté entre les plots ronds, ce qui peut également participer aux différents comportements observés. Des expériences préliminaires avec des plots carrés plus ou moins écartés

semblent confirmer que l'espacement de 10 $\mu$ m est optimal pour générer l'alignement observé. En effet, à ces dimensions, le chemin qui passe par les coins successifs des plots carrés forme une ligne droite bordée alternativement de coins des plots, qui contraint et guide le prolongement de migration, tout en laissant passer le noyau.

Contrairement à la plupart des types cellulaires qui s'alignent peu sur des plots, en comparaison à des tranchées par exemple, les neurones et leurs neurites en croissance sont fortement guidés par un relief de plots (Bugnicourt et al., 2014; Dowell-Mesfin et al., 2004; Hanson et al., 2009). De la même manière, les neurites montrent un guidage par contact perpendiculaire sur les tranchées, analogue à un guidage par structures discrètes (Gomez et al., 2007b; Rajnicek et al., 1997). Il a été proposé que ce type de guidage par des indices ponctuels discrets et successifs (« guidepost ») soit spécifique aux neurones (Hoffman-Kim et al., 2010). On peut en effet imaginer que ces indices discrets fournissent des points d'ancrage successifs sur lesquels une structure fine à croissance progressive telle qu'un prolongement neuronal peut s'appuyer. Le parallèle peut être fait avec les coins des plots carrés dans notre système, qui constituent également des indices adhésifs discrets et réguliers qui guident l'élongation du prolongement de migration. Les analyses faites en microscopie électronique qui montrent une interaction du prolongement de migration spécifiquement avec les coins des plots carrés appuient cette hypothèse.

À l'échelle de la structure entière, les angles droits des plots carrés créent une discontinuité et une forte courbure locale qui rendent difficile la déformation du prolongement de migration. À l'inverse, on observe régulièrement des prolongements se courbant autour d'un plot rond de même taille. Comme rapporté pour les axones en croissance (Renault et al., 2016), il semble donc exister un angle et une courbure limites au-delà desquels les prolongements de migration des neurones en migration ne peuvent pas se déformer. Cette forte courbure locale des plots carrés participe et renforce certainement le guidage et la directionnalité des interneurons observés sur ce relief.

**Ces différentes configurations de topographie, bien qu'artificielles, démontrent l'importance considérable que peut avoir l'architecture du micro-environnement sur les interneurons en migration et révèle pour la première fois la grande sensibilité de ces cellules au guidage par contact.**

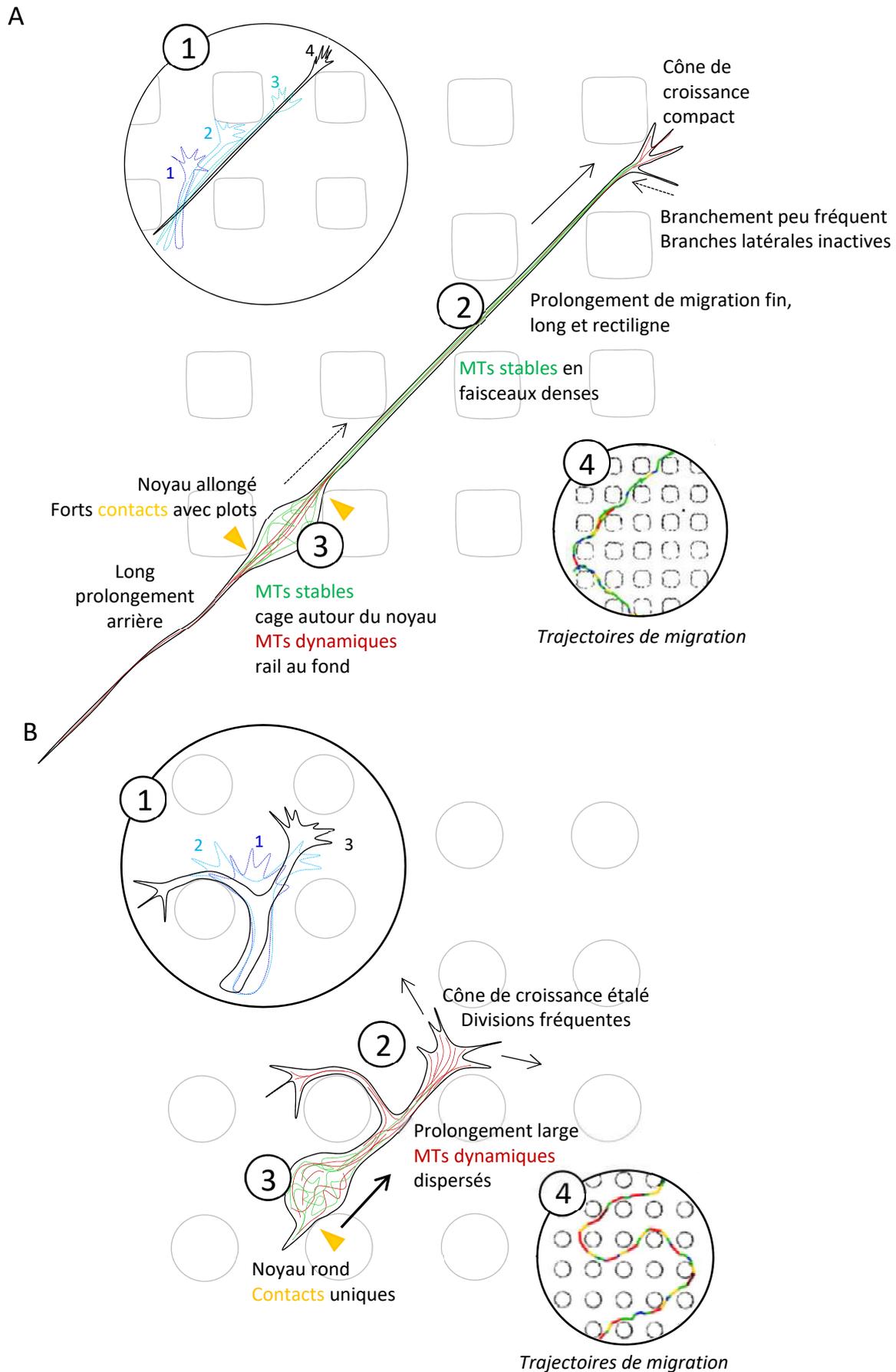


Figure 43 | Modèle récapitulatif des différents états cellulaires ségrévés et de leur mise en place

## 4.2 Modèle de la mise en place des différents états cellulaires observés

Pour résumer et combiner les différents résultats obtenus, je propose un modèle dynamique de la mise en place des différents états et comportements cellulaires observés entre plots ronds et plots carrés (voir schéma récapitulatif en figure 43).

Sur les plots carrés, le cône de croissance explore de manière dynamique et stochastique l'environnement. A la faveur de cette exploration, il peut s'engager par hasard dans le « chemin » diagonal (Fig.43A, étape 1). Cet espace, qui forme un chemin rectiligne bordé d'indices spatiaux ponctuels que sont les coins des plots carrés, guide et canalise le cône de croissance, puis rapidement le prolongement de migration qui le suit. Le prolongement de migration peut s'allonger dans cette direction, tandis que le noyau est retenu à l'arrière, et petit-à-petit s'affine et se stabilise. Il se comporte alors comme une « baguette rigide » qui impose un mouvement directionnel à l'avant de la cellule, et diminue la probabilité de formation de branches. Cette configuration s'auto-entretient et se renforce (Fig.43A, étape 2). A l'arrière, le noyau se déplace dans la direction du prolongement de migration, en se plaçant alternativement entre deux plots (Fig.43A, étape 3). Le mouvement de la cellule est donc globalement directionnel, mais peu motile (Fig.43A, étape 4). De manière stochastique, le cône de croissance peut former une branche qui va être stabilisée et sélectionnée, générant un changement de direction et la sortie du chemin diagonal. La cellule se raccourcit et peut alors enchaîner quelques cycles de migration d'un mouvement plus aléatoire associé à la formation de branches, jusqu'à ce que l'une d'entre elles s'engage à nouveau dans la diagonale, débutant un nouveau cycle directionnel. A l'échelle de la population, on observe donc une majorité de cellules longues et non branchées, correspondant aux cellules engagées dans le chemin diagonal, et une minorité de cellules courtes et branchées, correspondant aux phases courtes de transition entre deux phases directionnelles.

Entre les plots ronds, le cône de croissance a légèrement plus d'espace pour s'étaler, et forme donc des branches actives et équivalentes par divisions symétriques (Fig.43B, étape 1). Notons que le cône de croissance peut également s'engager par hasard dans la direction diagonale, mais ce chemin n'est ici pas assez canalisant pour conduire à un allongement et une stabilisation durable du prolongement. En effet, l'espace plus important entre les plots associé à leur forme fournit trop de possibilités d'échappement au cône de croissance et au prolongement qui peut se déformer et suivre la courbure du plot (Fig.43B, étape 2). A l'arrière, le noyau plus libre transloque de manière dynamique vers les points de bifurcations dans le prolongement de migration (Fig.43B, étape 3). Ce mécanisme s'auto-entretient ici encore en maintenant le prolongement de migration court, épais et branché.

Le branchement fréquent, associé au mouvement dynamique du noyau, conduit à un mouvement cellulaire rapide, mais peu directionnel dû à de nombreuses réorientations (Fig.43B, étape 4). A l'échelle de la population, on observe une majorité de morphologies courtes et branchées, et une minorité de cellules longues et non branchées, correspondant aux quelques cellules ayant réussi à se stabiliser sur le chemin diagonal.

### 4.3 Mécanismes intracellulaires et moléculaires impliqués

Les mécanismes intracellulaires et moléculaires impliqués dans la mise en place et/ou le maintien des différents comportements cellulaires décrits sur nos substrats microstructurés restent hypothétiques. Etant donné l'implication des complexes d'adhésion dans la réponse à la topographie, et à leur rôle central dans la détection et l'interaction avec le micro-environnement, nous avons analysé sur des cellules fixées la distribution et la morphologie des adhésions focales. Néanmoins, nous n'avons pu détecter aucune différence entre les interneurons sur plots carrés ou ronds pouvant expliquer les différents comportements observés. En particulier, aucune accumulation d'adhésions focales n'est visible au niveau des coins des plots carrés qui semblent pourtant guider l'allongement du prolongement de migration. Ce résultat négatif peut s'expliquer par la taille des structures topographiques utilisées ici. En effet, la plus grande surface d'adhésion pour la cellule reste la surface plane du fond du substrat sur laquelle elle se déplace et forme la majorité des adhésions focales. Les plots, de taille équivalente à celle du corps cellulaire, ne forment à l'échelle de la cellule que de petites surfaces adhésives additionnelles latérales et sont donc peu susceptibles de générer une réorganisation importante des adhésions focales. Notons que les études démontrant que la topographie contraint la formation des adhésions focales ont utilisé des structures de taille nanométrique placées sous les cellules, compatibles par leur taille et leur arrangement avec une action sur les adhésions focales, comme nous allons discuter plus avant par la suite.

Un nombre important d'études sur différents types cellulaires ont décrit un alignement du cytosquelette, en particulier d'actine, dans la direction de l'allongement cellulaire engendré par le relief du substrat. Nous avons également observé un tel alignement mais surtout au niveau des microtubules, nombreux dans les neurones en migration. Cet alignement, particulièrement frappant dans les longues cellules sur la diagonale des plots carrés, est associé à une stabilisation des microtubules dans le prolongement de migration. Ces résultats indiquent que le réseau de microtubules pourrait être impliqué dans la mise en place et/ou le maintien de l'alignement cellulaire observé entre les plots carrés. Il serait intéressant de tester cette implication par l'application de drogues perturbant ou stabilisant le réseau de microtubules dans les interneurons en migration entre les différents types de plots.

Pour finir, des expériences d'observation de la dynamique de la myosine IIB ont révélé des accumulations de cette protéine au niveau des contacts entre les interneurons en migration et les plots, et en particulier au niveau des coins des plots carrés (voir partie « résultats supplémentaires » §2.5 figure 35). Cette observation concerne une petite minorité de cellules et ne semble donc pas être un mécanisme général de réponse au relief, mais constitue une piste qu'il peut être intéressant d'explorer et de comprendre plus avant. Un mécanisme similaire a déjà été observé sur des fibroblastes en migration sur des plots ronds, pour lesquels Frey et al. ont décrit une réponse au relief impliquant des contractions locales dépendantes de la myosine II au niveau des plots (Frey et al., 2006).

Les mécanismes moléculaires de signalisation impliqués dans la réponse au relief restent de manière générale encore largement inconnus. Comme mentionné en introduction (chapitre 2 §2.3.4), il est tentant de spéculer que ces mécanismes soient similaires à ceux impliqués dans les processus de mécanotransduction. En particulier, la signalisation calcique induite par l'activation de canaux ioniques activés par l'étirement, qui agit sur un certain nombre d'éléments liés au cytosquelette, est un candidat séduisant qui a déjà été impliqué dans l'alignement neuritique en réponse au relief (Rajnicek et al., 1997). Dans notre système, il pourrait être intéressant d'utiliser une approche non biaisée et d'analyser les éventuels changements d'expression génétique par séquençage d'ARN des interneurons sur nos deux types de topographie. Ce type de technique, déjà utilisé sur d'autres types cellulaires (Gasiorowski et al., 2010), pourrait faire apparaître des candidats importants pour la compréhension des mécanismes intracellulaires et moléculaires impliqués dans les différentes réponses à la topographie décrits dans notre étude.

#### 4.4 La topographie : guide ou obstacle ?

Si le terme de « guidage par contact » est associé aux structures topographiques, les présentant ainsi comme des indices positifs pour la migration cellulaire, ces structures qui encombrant l'espace peuvent également être considérées comme des obstacles au mouvement des cellules. Cette distinction subtile voire sémantique est néanmoins intéressante à discuter à la lumière des résultats de cette étude. La ligne fine qui sépare ces deux notions est révélée par les résultats des tests des différentes molécules d'adhésion sur substrat plat ou microstructuré. De manière intéressante, si un substrat de N-cadhérine augmente les surfaces de migration sur une surface plane par rapport à un mélange N-cadhérine et laminine, ce résultat est inversé sur un substrat microstructuré, où la N-cadhérine associée aux plots tend à diminuer les surfaces de migration. Ce résultat suggère que la nature adhésive des indices topographiques peut déterminer son action en tant que « guide » ou « obstacle ».

La taille des structures, en relation avec la taille des différents éléments cellulaires, peut également jouer un rôle dans cette distinction. De manière générale, l'idée qui ressort de la littérature est que la réponse au relief s'atténue pour les structures de grande taille. En effet, sur un relief nanométrique, les structures peuvent avoir une action directe sur différents éléments subcellulaires (récepteurs, complexes d'adhésions, cytosquelette, etc.), modifier ainsi efficacement l'organisation intracellulaire, et par conséquent les réponses cellulaires. Par ailleurs, sur cette taille de relief, les éléments d'exploration et de guidage de la cellule, filipodes ou lamellipodes, peuvent détecter les structures en y établissant des interactions adhésives actives et spécifiques. A l'inverse, des structures micrométriques de l'ordre de grandeur de la cellule, génèrent des contraintes spatiales plus générales, qui provoquent ensuite des réarrangements intracellulaires. Notre étude se place plutôt dans le cadre de ce second type de « guidage » par des indices topographiques de grande taille, qui exercent des contraintes spatiales globales sur la forme et la navigation des interneurones.

Ces deux « types » de guidage par contact, le premier où les structures topographiques guident plutôt « activement » et l'autre où elles contraignent plutôt « passivement » les cellules, impliquent des séquences d'évènements différentes et donc des mécanismes moléculaires potentiellement différents qu'il serait intéressant de mieux comprendre. En effet, *in vivo*, ces deux types d'échelles de taille de structures sont présentes et cohabitent dans l'environnement extracellulaire. Les cellules sont donc susceptibles d'expérimenter une combinaison de ces deux types de guidage par contact, ce qui complexifie d'autant plus les réponses cellulaires. Certains travaux dans le domaine de l'ingénierie tissulaire ont déjà commencé à combiner des indices nanométriques et micrométriques pour optimiser leurs systèmes biomimétiques (Moffa et al., 2014; Seonwoo et al., 2016).

---

## 5 Implications de ces résultats dans un cadre physiologique

---

### 5.1 Comportements dynamiques et stratégies de migration *in vitro* et *in vivo*

Dans notre système de culture *in vitro*, nous avons pu mettre en évidence deux types de comportements migratoires, associés à différentes morphologies : une migration lente mais directionnelle de cellules longues non branchées entre les plots carrés et une migration dynamique mais peu directionnelle de cellules courtes et branchées entre les plots ronds. Sur une surface plane, les interneurones se

déplacent en enchaînant des cycles de mouvement qui alternent des phases d'allongement et de branchement du prolongement de migration, et des phases d'avancée nucléaire, comme décrit dans un environnement physiologique (Bellion et al., 2005). Cette observation nous indique que ce cycle de migration est une propriété fondamentale des interneurones en migration. A plus grande échelle de temps et de distance, les trajectoires observées sur une surface plane nous montrent également que les interneurones en migration alternent entre des phases directionnelles (plutôt associées à des morphologies unipolaires), et des phases de réorientations (associées à des épisodes de branchement). On peut ainsi observer des cellules qui passent d'une morphologie longue et non branchée à une morphologie courte et branchée. Ce résultat suggère que les différents modes de migration observés dans les environnements microstructurés correspondent en fait à différentes phases qu'une même cellule peut alternativement adopter au cours de sa migration (et nous conforte dans l'idée qu'il ne s'agit pas de deux populations différentes d'interneurones).

Dans le cerveau en développement, les interneurones en migration de l'EGM au cortex alternent également entre différentes phases de mouvement. Même s'il est difficile de prouver strictement cette affirmation de par la complexité de filmer un interneurone sur toute la durée de sa migration dans un environnement 3D, on sait que les interneurones passent de phases de migration directionnelle (dans les flux de migration vers le cortex par exemple) à des phases de réorientation (vers la plaque corticale dans le cortex). Les comportements mis en évidence dans notre système *in vitro* ne sont donc pas totalement artificiels mais correspondent à des comportements physiologiques, ce qui en rend d'autant plus intéressante l'utilisation.

De manière plus conceptuelle, ces deux comportements migratoires peuvent être vus comme deux stratégies de migration différentes, mais complémentaires. La première est analogue à un mouvement dirigé, vers une source attractive par exemple. La seconde correspond à un mouvement plus exploratoire. Ce second type de mouvement peut au premier abord apparaître comme une stratégie peu efficace. Néanmoins, une exploration aléatoire, en augmentant l'espace parcouru, permet également de maximiser la détection d'indices dans l'environnement. Ainsi, des études de modélisation sur diverses cellules motiles ont montré que des mouvements dérivés de marches aléatoires constituaient des stratégies de déplacement efficaces dans la recherche de cibles (Li et al., 2008b). *In vivo*, les mouvements aléatoires permettent d'augmenter la dispersion cellulaire et donc la colonisation de l'espace, comme cela a été décrit pour les interneurones dans la zone marginale (Tanaka et al., 2009). Dans cette étude, il a été proposé que le mouvement aléatoire des interneurones dans cette zone constituait un comportement intrinsèque adopté en l'absence de signaux chimiques extérieurs. Cette hypothèse se rapproche de ce que nous pouvons observer dans notre système *in vitro* avec les plots ronds. Néanmoins, nous montrons également qu'un simple changement de la géométrie de la

topographie de l'environnement est suffisant pour orienter la cellule vers une stratégie de mouvement exploratoire ou dirigée. Il est également intéressant de constater que dans notre système, ces deux types de comportements dynamiques conduisent finalement aux mêmes distances de migration parcourues. *In vivo*, elles servent de manière complémentaire et adaptée la migration des interneurones à deux stades de leur parcours et de leur vie.

## 5.2 Influence des paramètres physiques de l'environnement *in vivo* ?

Dans cette étude, ces deux modes de migration ont été séparés en changeant la géométrie du relief du microenvironnement. Il apparaît donc finalement que la topographie, en favorisant la mise en place et le maintien d'états cellulaires particuliers, stabilise certaines phases migratoires et les fait prédominer au niveau de la population. Même si le type de relief, plots carrés ou ronds, n'est évidemment pas comparable au relief du cerveau en développement, les preuves de concept qu'amènent ces résultats sont intéressants à discuter dans un cadre physiologique. Ainsi, le résultat général de cette étude est qu'un changement de forme (indices discrets versus continus par exemple), de distribution ou de densité des structures adhésives dans l'environnement extracellulaire est capable de changer la morphologie et le mode de migration des interneurones en migration. Ce résultat est lui transférable *in vivo*, où les interneurones expérimentent ce genre de discontinuités environnementales au cours de leur migration. Un exemple dont il est facile de se convaincre au simple examen d'une coupe coronale de cortex embryonnaire est la différence de densité des corps cellulaires dans les différentes couches corticales. De manière intéressante, c'est à ce niveau que les interneurones changent leur mode de migration de directionnel à exploratoire pour sortir des flux de migration et coloniser le cortex. Jusqu'ici, seuls des facteurs chimiques ont été impliqués dans ce changement de comportement cellulaire. A la lumière des résultats de cette étude, on peut émettre l'hypothèse que la topographie de l'environnement cellulaire influence également la migration des interneurones et participe à ce changement de comportement migratoire au niveau du cortex. En réalité, les différents paramètres biophysiques de l'environnement, par exemple la topographie et la rigidité, sont liés. Plus largement, c'est donc l'ensemble des propriétés géométriques et mécaniques de l'environnement qu'il faut maintenant prendre en compte pour comprendre de manière intégrée les comportements migratoires des neurones embryonnaires.

Cette hypothèse peut avoir des implications importantes, notamment dans un cadre pathologique. On a évoqué en introduction certains syndromes ou pathologies neurodéveloppementales qui impliquent

des défauts de migration des interneurones (chapitre 3 §3.4). Certaines mutations à l'origine de ces pathologies touchent le cytosquelette et conduisent par exemple à des défauts de branchement qui provoquent une migration anormale des neurones (Lis1 ou DCX impliqués dans la lissencéphalie par exemple) (Gopal et al., 2010; Kappeler et al., 2006; Nasrallah et al., 2006). En plus de ces défauts purement cellulaires, on peut également imaginer que les interneurones mutants présentent une réponse à la topographie de l'environnement altérée, aggravant d'autant plus les défauts de positionnement des interneurones observés dans ce type de pathologies.

De manière plus indirecte et non cellulaire-autonome, il est intéressant de noter qu'un grand nombre de ces pathologies et les mutations qui y sont liées conduisent à des altérations de l'architecture du cerveau et en particulier du cortex. On peut notamment citer un certain nombre de mutations liées à l'adhésion (intégrines, dystroglycanes, kinases associées aux adhésions focales FAK ou aux intégrines Ilk) ou d'éléments de la matrice extracellulaire (laminine) qui génèrent des défauts de lamination du cortex, ou des hétérotopies retrouvées dans un certain nombre de syndromes comme la lissencéphalie ou la dysplasie corticale (Beggs et al., 2003; Graus-Porta et al., 2001; Halfter et al., 2002; Niewmierzycka et al., 2005; Satz et al., 2010). Dans ce type de situations, on peut imaginer un effet non cellulaire-autonome sur les interneurones où l'altération de l'environnement et de son organisation perturbe de manière indirecte leur migration, participant voire renforçant ainsi les défauts observés

---

## Conclusion

---

Les signaux biochimiques ont longtemps été au centre de notre vision du développement du cerveau et de la mise en place des circuits neuronaux. Mes travaux de thèse et les résultats qu'ils ont générés s'intègrent dans un nouveau mouvement qui place également l'environnement biophysique et mécanique au cœur de ces processus neurodéveloppementaux (Barnes et al., 2017; Gangatharan et al., 2018). Depuis la prolifération des cellules souches jusqu'à la formation des synapses, en passant par la migration neuronale et la croissance axonale, les exemples de l'importance des contraintes spatiales et mécaniques se multiplient. A l'autre extrême de la vie de l'organisme, elles sont également de plus en plus impliquées dans les processus neurodégénératifs et cancéreux (Barnes et al., 2017). Initié par de fructueux efforts collaboratifs entre biologistes et physiciens, ce nouvel engouement pour les questions de biophysique et biomécanique a débuté par des démonstrations *in vitro*. Grâce au développement récent de nouveaux outils combinant imagerie *in vivo* et perturbations physiques ciblées de l'environnement, les preuves de l'importance physiologique de ces processus et de ces nouveaux concepts commencent à émerger (Breau et al., 2017; Koser et al., 2016). Ces études collaboratives interdisciplinaires, auxquelles j'ai eu la chance de participer pendant ma thèse, s'inscrivent dans une dynamique globale de décroisement des disciplines qui, j'en suis convaincue, va nous permettre d'avancer technologiquement et conceptuellement dans notre compréhension des processus biologiques, ainsi que dans le développement des thérapies de demain.



# Travaux annexes



Travail annexe (article publié)

## Modèles *in vitro* pour l'analyse de la migration des interneurones en provenance de l'EGM

« *In vitro* models to analyze the migration of MGE-derived interneurons »

Claire Leclech & Christine Métin

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de rédiger cet article méthodologique, publié dans l'ouvrage *Cell migration: Methods and Protocols (Methods in Molecular biology, vol. 1749)*, qui présente les différents types de culture *in vitro* pratiqués dans le laboratoire de Christine Métin pour étudier la migration des interneurones corticaux. Nous présentons et comparons en particulier deux méthodes : la culture primaire d'interneurones sur lamelle de verre recouvertes de molécules d'adhésion, et les co-cultures, où les interneurones sont cultivés sur un substrat de cellules corticales dissociées.

La culture d'interneurones sur lamelles de verre recouvertes de molécules d'adhésion permet de tester l'influence de ces molécules sur le déplacement des cellules. Elle permet également de visualiser parfaitement des interneurones individuels dans un environnement simplifié, et constitue ainsi une méthode de choix pour l'étude de l'organisation intracellulaire des interneurones. Nous présentons ici deux types de coating : laminine seule, ou un mélange N-cadhérine et laminine.

Les co-cultures d'interneurones sur cellules corticales permet de visualiser une migration soutenue (jusqu'à 3 jours) sur un substrat plus proche de l'environnement physiologique des interneurones. En revanche, la visualisation des interneurones est moins résolutive, et nécessite l'utilisation de cellules fluorescentes pour les distinguer du substrat.

Les étapes de fabrication des boîtes de cultures pour la vidéomicroscopie, de coating des lamelles, de dissection et d'enregistrement des interneurones en migration sont les mêmes que celles utilisées dans mes travaux de thèse sur substrats microstructurés. J'ai pu participer à l'optimisation d'un certain nombre de ces étapes, qui sont présentées ici de manière très détaillée. Cet article constitue ainsi un complément d'informations intéressant sur les méthodes présentées dans la partie « Résultats » de ce manuscrit.





## In Vitro Models to Analyze the Migration of MGE-Derived Interneurons

Claire Leclech and Christine Métin

### Abstract

In the developing brain, MGE-derived interneuron precursors migrate tangentially long distances to reach the cortex in which they later establish connections with the principal cortical cells to control the activity of adult cortical circuits. Interneuron precursors exhibit complex morphologies and migratory properties, which are difficult to study in the heterogeneous and uncontrolled in vivo environment. Here, we describe two in vitro models in which the migration environment of interneuron precursors is significantly simplified and where their migration can be observed for one to 3 days. In one model, MGE-derived interneuron precursors are cultured and migrate on a flat synthetic substrate. In the other model, fluorescent MGE-derived interneuron precursors migrate on a monolayer of dissociated cortical cells. In both models, cell movements can be recorded by time-lapse microscopy for dynamic analyses.

**Key words** Embryonic neurons, Interneurons, Cerebral cortex, Medial ganglionic eminence, Tangential migration, Migration assay, Culture, Cocultures, Culture dishes for videomicroscopy

---

### 1 Introduction

In the developing brain, postmitotic cells actively migrate away from the proliferative area surrounding the future ventricles to reach their target region where they will differentiate and establish functional connections. Two modes of neuronal migration coexist, either radial or tangential, according to the direction of movement. After leaving the proliferative region from its basal side, most neural cells migrate perpendicularly to the central lumen, e.g., radially. Alternatively, some populations migrate tangentially, e.g., parallel to the surface of the brain. They form several streams distributed at the surface or in deeper parts of the developing brain [1].

The tangential mode of migration was first discovered by lineage tracing experiments in the late 1980s [2, 3], and confirmed by pioneering time-lapse experiments in organotypic slices [4]. Genetic studies in the late 1990s established that GABAergic neurons use this tangential mode of migration and can travel very long

distances to colonize the whole brain from restricted proliferative zones located in ventral regions [5, 6]. In particular, the inhibitory GABAergic cortical interneurons, which control the activity of cortical circuits in the adult, are born in the ganglionic eminences (GEs) of the basal telencephalon and migrate a long distance to reach the developing cortex. The correct positioning of these neurons in their cortical target, which critically influences their function, largely depends on their migratory properties. Therefore, impaired migration of cortical interneurons can lead to neurodevelopmental pathologies such as neuropsychiatric disorders [7].

We use interneuron precursors born in the medial ganglionic eminence (MGE) as a model system to study the cellular and molecular mechanisms controlling the tangential migration of embryonic neurons. MGE-derived interneurons exhibit complex morphologies with branched leading processes [8, 9] and the precise characterization of their migratory properties is often difficult in the complex 3D physiological environment. For this reason, we have designed *in vitro* models where MGE-derived cells migrate on flat substrates. Two types of *in vitro* migration assays have been developed: culture of MGE-derived interneuron precursors on a synthetic substrate [10, 11] or coculture of MGE-derived interneuron precursors on a monolayer of dissociated cortical cells [12].

Cultures of MGE explants on a synthetic substrate have been designed to test the role of adhesive contacts on the migratory properties of interneurons, in particular the role of integrin and N-cadherin (Ncad) mediated adhesive interactions. We describe here a mixed synthetic substrate of laminin and Ncad onto which MGE exhibit an active migration [10] (*see* Subheading 3.2 below). These cultures allow the visualization of isolated neurons migrating in a controlled 2D adhesive environment, and of their intracellular organization (cytoskeleton, adhesive contacts or signaling molecules).

We have designed another *in vitro* model in which MGE cells are allowed to migrate on a flat monolayer of dissociated cortical cells themselves plated on a laminin substrate. To identify and image MGE cells in these cocultures, we are using donor embryos expressing a fluorescent marker, either GFP or RFP [12] (*see* Subheading 3.3 below). MGE cells migrate here in a simplified environment that no longer shows any complex 3D structure, but in which functional interactions with cells from the cortical target are preserved. These cocultures can be easily treated with pharmacological compounds or used to analyze how mutations in either cortical or MGE cells can influence the migratory behavior of interneuron precursors.

In both types of cultures, MGE-derived interneurons migration can be imaged by time-lapse videomicroscopy and subsequently analyzed.

## 2 Materials

### 2.1 Preparation of Culture Dishes for Videomicroscopy

1. Round glass coverslips diameter 20 mm, thickness No. 1.5.
2. Stainless steel racks for glass coverslips with removable handle.
3. Glass coloration boxes with glass covers.
4. Glass petri dishes diameter 60 mm.
5. Plastic culture dishes (40 mm TPP or any 35 mm dish with thick bottom).
6. Hole punch set (hand tool in metal for making holes).
7. Deburring tool (to deburr inner hole edges).
8. Addition-curing duplicating silicone for dentistry (Twinsil speed 22 blue/yellow, Rotec).
9. Nitric acid 67%.
10. Ethanol 95°.
11. MilliQ water.
12. Drying oven.

### 2.2 Coating

#### *Stock solutions of coating proteins*

1. Poly-L-lysine (MW 538000): Stock solution at 2 mg/mL in water. Aliquots of 100  $\mu$ L stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .
2. Laminin (from mouse sarcoma): Stock solution at 1 mg/mL in DMEM/F12, aliquots of 10 or 20  $\mu$ L stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .
3. Recombinant Mouse or Human N-cadherin Fc Chimera (R&D systems, sterile solution). Aliquots of 2 or 4  $\mu$ g stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .
4. Anti-human IgG Fc produced in goat (Sigma). Buffered stock solution at 2 mg/mL. Aliquots of 10  $\mu$ L stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .
5. Bovine Serum Albumin (BSA): sterile, cultured tested, lyophilized powder.

#### *Buffers and solutions*

6. Sterile milliQ water.
7. Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12). Store at  $4^{\circ}\text{C}$ .
8. Borate buffer: Prepare Borax solution 0.1 M by dissolving 3.8 g of Borax ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ , MW: 381) in 100 mL of milliQ water. Prepare HCl solution 0.1 M (1 mL of HCl 36% in 100 mL of milliQ water). Place a pH-meter into the Borax solution and pour HCl solution in borax solution until pH 8.2. Filter at 0.2  $\mu\text{m}$  under a hood, and store in a sterile bottle at  $4^{\circ}\text{C}$  for months.

9. Saturation solution for N-Cadherin coating: prepare stock solution of BSA at 1.5% in sterile borate buffer. Store aliquots of 1 mL at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### *Material*

10. Laminar flow hood.
11.  $\text{CO}_2$  incubator at  $37^{\circ}\text{C}$  with water Jacket.
12. Sterile filtering bottle equipped with a  $0.2\ \mu\text{m}$  filter.
13. pH meter.

### **2.3 Dissection and Culture**

#### *Buffers and solutions*

1. Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12). Store at  $4^{\circ}\text{C}$ .
2. Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) without phenol red. Store at  $4^{\circ}\text{C}$ .
3. Leibovitz's L-15 Medium (L-15). Store at  $4^{\circ}\text{C}$ .
4. GlutaMAX supplement, 100 $\times$  solution. Store at  $4^{\circ}\text{C}$ .
5. HEPES buffer solution 1 M. Store at  $4^{\circ}\text{C}$ .
6. Glucose 30% in water, filtered at  $0.2\ \mu\text{m}$  under a laminar flow hood. Aliquots of  $665\ \mu\text{L}$  stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .
7. N2 supplement 100 $\times$ . Aliquots of  $100\ \mu\text{L}$  stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .
8. B27 supplement 50 $\times$ . Aliquots of  $200\ \mu\text{L}$  stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .
9. Penicillin–streptomycin solution (10,000 U/mL). Aliquots of 5 mL stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .
10. Sodium pyruvate solution 100 mM stored at  $4^{\circ}\text{C}$ .
11. Fetal Calf Serum (FCS) decomplexed (30 min at  $56^{\circ}\text{C}$ ). Aliquots of 1 mL stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Culture and dissection medium (prepared just before the dissection or a day before, in sterile conditions under a laminar flow hood). Culture medium were adapted from [13].*

12. Dissection medium: L-15 with 1% penicillin–streptomycin (5 mL for 500 mL L-15).
13. Dissociation medium: 9 mL DMEM/F-12; 1 mL CFS. Can be used for 1 week.
14. Culture Medium 1 $\times$ : 50 mL DMEM/F-12,  $500\ \mu\text{L}$  GlutaMAX 100 $\times$ ,  $500\ \mu\text{L}$  HEPES 1 M,  $500\ \mu\text{L}$  of penicillin–streptomycin (10,000 U/mL),  $665\ \mu\text{L}$  of glucose 30%. Can be used for 2 weeks if the color remains salmon.
15. Complete Culture Medium: 10 mL Culture Medium 1 $\times$ ,  $100\ \mu\text{L}$  of penicillin–streptomycin,  $100\ \mu\text{L}$  of N2 Supplement 100 $\times$ ,  $200\ \mu\text{L}$  B27 Supplement 50 $\times$ . Can be used for 1 week.

16. Video Culture Medium 1×: 50 mL DMEM/F12 without Phenol Red, 500  $\mu$ L GlutaMAX 100×, 250  $\mu$ L HEPES 1 M, 500  $\mu$ L of penicillin–streptomycin, 665  $\mu$ L of glucose 30%, 500  $\mu$ L of sodium pyruvate 100 mM. Can be used for 1 week.
17. Complete Video Culture Medium: 10 mL Video Culture Medium 1×, 100  $\mu$ L of N2 Supplement 100×, 200  $\mu$ L B27 Supplement 50×. Can be used for 1 week.

#### *Dissection*

18. Dissection tools: 1 pair of iris scissors, 1 pair of spring scissors with 3–4 mm blades, 2 pairs of Dumont #5 forceps (tip Biology), 1 pair of Dumont #3 forceps, 1 pair of curved forceps, 2 tungsten needles with the tip bent at 90° (we use tungsten needles for extracellular recording). *After each dissection, tools are carefully cleaned with a toothbrush and detergent (TDF4), rinsed, dried and stored in a clean box.*
19. Sterile plastic pipettes (3 mL).
20. Beaker of 150 mL filled with ethanol 95°.
21. Beaker of 150 mL filled with sterile PBS 1×.
22. Isothermal box filled with ice and covered with a clean aluminum foil.
23. Large (2× diameter 100 mm), medium (5× diameter 60 mm) and small (2× diameter 35 mm) sterile plastic petri dishes filled with dissection medium and stored on ice.
24. Dissecting binocular microscope.
25. Fluorescent binocular microscope or microscope with a low magnification objective.
26. Counting chamber.
27. CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C with water Jacket.

---

## 3 Methods

### **3.1 Preparation of Culture Dishes for Videomicroscopy**

*The culture dishes for videomicroscopy have to be prepared in advance. Our protocol is adapted from the protocol of Carol Mason's lab [14].*

#### **3.1.1 Cleaning of the Glass Coverslips**

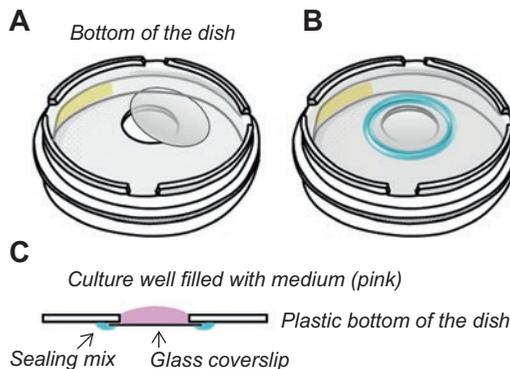
1. Distribute the coverslips in stainless steel racks. Using the removable handle, put the racks in a clean and dry glass coloration box and, under a chemical hood, cover the coverslips with nitric acid 67%. Close the box with a glass cover and put a label “DANGER” on it. Leave the coverslips overnight under the hood.
2. The next day, under the hood, transfer the racks using the removable handle in another glass coloration box filled with MilliQ water. Discard nitric acid with a glass funnel in a trash

bottle. Use several sets of glass coloration boxes to rinse the coverslips at least ten times, until the smell of acid has disappeared.

3. Put the racks in a clean and dry coloration box and cover them with ethanol 95° for 2–3 h.
4. Rinse the coverslips with distilled water five times. Then transfer the racks in a clean and dry glass coloration box kept slightly open. Leave it under a laminar flow hood until the coverslips are completely dry (this can take more than 1 day).
5. Distribute the dry coverslips in clean and sterile glass petri dish and sterilize them in a dry oven at 210 °C.

### 3.1.2 Culture Dishes for Videomicroscopy (See Fig. 1)

1. With the hole punch tool, drill a hole of 14 mm diameter in the center of the bottom of 40 mm TPP plastic dishes (*see Note 1*). Then, smooth the inner edge of the hole with a deburring tool.
2. Turn the dishes bottom up and place on the outside of the dish a 20 mm cleaned glass coverslip centered on the hole to close it (*see Fig. 1a*).
3. Prepare a small amount of twinsil silicone by mixing equal volumes of blue and yellow components (*see Note 2*). While the mix is still liquid (only a couple of minutes after mixing), create a thin ring of silicone around the coverslip to seal it on the external side of the plastic dish (*see Fig. 1b*). To avoid leakage of silicone below the coverslip, gently press it on the dish. After the mix hardens, the coverslip is efficiently sealed at the bottom of the box creating a small well in the dish (*see Fig. 1c*).



**Fig. 1** Culture dishes for videomicroscopy. (a) An acid nitric treated glass coverslip closes the central hole performed with a hand punch tool in the bottom of a 40 mm plastic culture dish. (b) The coverslip is sealed with a ring of silicone (blue) on the external side of the dish. (c) Cross-sectional view shows the small culture well thus created in the dish, equipped with a glass bottom

4. When the twinstil silicone is dry, immerse the dishes and their covers in a beaker full of ethanol 95° for 30 min minimum. Rinse them three times with distilled water and let them dry under the laminar flow hood. Close the boxes and store them in a hermetic box (*see Note 3*).

### **3.2 Protocol 1: Culture of MGE- Derived Interneurons Migrating on a Synthetic Substrate**

#### **3.2.1 Coating: N-Cadherin and Laminin (See Note 4)**

*All steps should be done in sterile conditions under a laminar flow hood. Let aliquots of frozen coating proteins thaw in the fridge before use. The protocol to coat coverslips with Ncad is adapted from [15].*

1. *The day before the dissection, coat with poly-L-lysine (PLL)*
  - (a) Dilute the stock PLL in sterile water at a final concentration of 200 µg/mL. Put approximately 150 µL of the PLL solution on each coverslip in the culture dishes. The solution should cover the whole coverslip and fill the small well above (*see Fig. 1c*). Close the box and incubate at least 3 h in a CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C (*see Note 5*).
  - (b) Aspirate the PLL solution, and rinse the coverslip three times with sterile water. Let the coverslip dry under the laminar flow hood for at least 30 min, boxes open (*see Note 6*). Dry boxes can be closed and stored at 4 °C in a sterile airtight box for 1 or 2 weeks.
2. *The night before the dissection, incubate with laminin (LN) and anti-human Fc (hFc)*
  - (a) Dilute the stock LN at a final concentration of 8 µg/mL and the stock hFc at a final concentration of 4 µg/mL in borate buffer. Put approximately 150 µL of the LN + hFc solution on each coverslip to cover it. Close the box and incubate overnight at 4 °C (*see Note 7*).
3. *The morning of the dissection, coat with N-Cadherin (NCad)*
  - (a) Dilute the stock NCad in borate buffer to have a final concentration of 0.25 µg per cm<sup>2</sup> of coverslip (the coverslip surface of a 14 mm hole is rounded up to 1 cm<sup>2</sup>).
  - (b) Aspirate the LN + hFc and rinse it once with borate buffer. At this point the coverslip should never dry. Put approximately 150 µL of the NCad solution on each coverslip to cover it. Close the box and incubate 2 h at 37 °C in the CO<sub>2</sub> incubator. Start the dissection (*see Subheading 3.2.2*) during this incubation time.
  - (c) Aspirate the Ncad solution and rinse once with borate buffer. To saturate hFc antibody sites unbound with recombinant Ncad, incubate the coverslips with the saturation buffer (1.5% BSA in borate buffer) for 10 min. Aspirate and replace directly with 200 µL of Complete Culture Medium. Close the boxes and let them wait at 37 °C in the CO<sub>2</sub> incubator, if necessary.

3.2.2 *Dissection and Culture (See Fig. 2)*

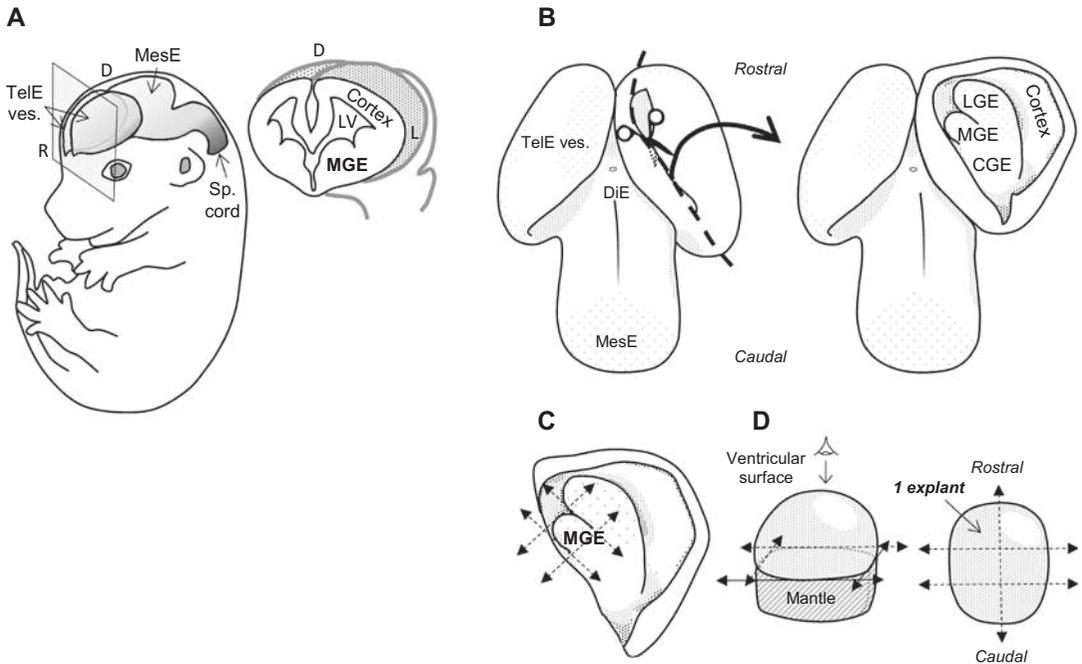
*Use a pregnant mouse with gestation dated at embryonic day E12.5 or E13.5.*

1. *Embryonic brain dissection*

- (a) Put the petri dishes filled with the dissection medium on ice (*see* Subheading 2.3). Put the clean tools in the beaker filled with ethanol 95°, and use the beaker filled with sterile PBS to rinse ethanol on tools before using them.
- (b) On a clean bench outside the culture room, prepare a sheet of absorbent paper, a 100 mm diameter petri dish filled with cold dissection medium, a pair of iris scissors and the Dumont #3 forceps previously stored in the beaker of ethanol. Kill the pregnant mouse by cervical elongation (according to validated ethical procedures). Place the mouse on the paper, abdomen up, and wash the skin of the abdomen with ethanol 95°. Open the abdomen with a long sagittal cut (first skin, then muscles). Collect the uterine horns containing the embryos in the petri dish filled with cold dissection medium. Transport the petri dish in the culture room and put it on ice (*see* **Note 8**). Discard the dead mouse in a freezer, and quickly clean the tools.
- (c) Transfer the uterine horns in a large petri dish filled with clean dissection medium. With the clean iris scissors, cut the uterine muscle all along the horns to expose embryos in their amniotic envelope. With the tips of Dumont #5 forceps, break the amniotic bag, extract the embryos and cut their head. Transfer heads using the curved forceps in a 60 mm petri dish with clean cold dissection medium.
- (d) To extract the brain, remove the skin and the connective tissue around it. To do so, gently insert the tip of a Dumont #5 forceps at the basis of each telencephalic vesicle and peel off the skin and the connective tissue. When the brain is uncovered, section it at the back between the cerebellum and the spinal cord with the fine forceps. Gently detach the brain from the brain cavity with the Dumont #5 forceps, progressing from caudal to rostral. Transfer the dissected brains in another 60 mm petri dish of clean cold dissection medium.

2. *MGE dissection (see Fig. 2)*

- (a) The MGE protrudes in the lateral ventricle of the telencephalic vesicle. To access the MGE, open the telencephalic vesicle dorsally with the spring scissors, and section the vesicle along the medial midline. Pursue the cut both rostrally and caudally in order to completely detach the lateral wall of the telencephalic vesicle, which comprises the cortex and the MGE (*see* Fig. 2b).



**Fig. 2** Dissection of the Medial Ganglionic Eminence (MGE). **(a)** Scheme showing the brain of an E12.5/E13.5 mouse embryo. On the right, a coronal section through both telencephalic vesicles (TelE Ves.) shows the embryonic cortex and the MGE protruding in the lateral ventricle (LV). **(b–d)** illustrate the main steps of the MGE dissection. **(b)** In a telencephalic vesicle opened by its dorsal side, the cortical and MGE regions are clearly visible on the ventricular side. **(c, d)** The MGE is removed with 4 cuts **(c)**, detached from the mantle zone **(d)** and cut in 6–8 pieces (explants) perpendicular to the ventricular surface. *MesE* mesencephalon, *DiE* diencephalon, *Sp. Cord* spinal cord, *LGE* lateral ganglionic eminence, *D* dorsal, *L* lateral, *R* rostral

- (b) When the lateral wall of the telencephalic vesicle is turned ventricular side up, the MGE appears as a small “ball.” To isolate the MGE, perform 4 cuts around it with a thin tungsten needle, perpendicular to the ventricular surface (*see* Fig. 2c). Then, detach the region of the MGE protruding in the ventricle with a cut parallel to the ventricular surface: the mantle zone (postmitotic structure) should be removed, because it will contaminate the culture with postmitotic neurons (*see* Fig. 2d). Transfer the dissected MGEs in a 35 mm diameter petri dish filled with cold dissection medium using a sterile plastic pipette. Store MGEs on ice.

### 3. Culture

- (a) Right before transferring a MGE in a culture dish, cut it in 6/8 pieces (called explants). Each explant should contain a small part of the ventricular and subventricular zone (*see* Fig. 2d and **Note 9**). Sections are made with the tungsten

needles, perpendicular to the ventricular surface of the MGE. Each culture well will contain all the explants of a single MGE.

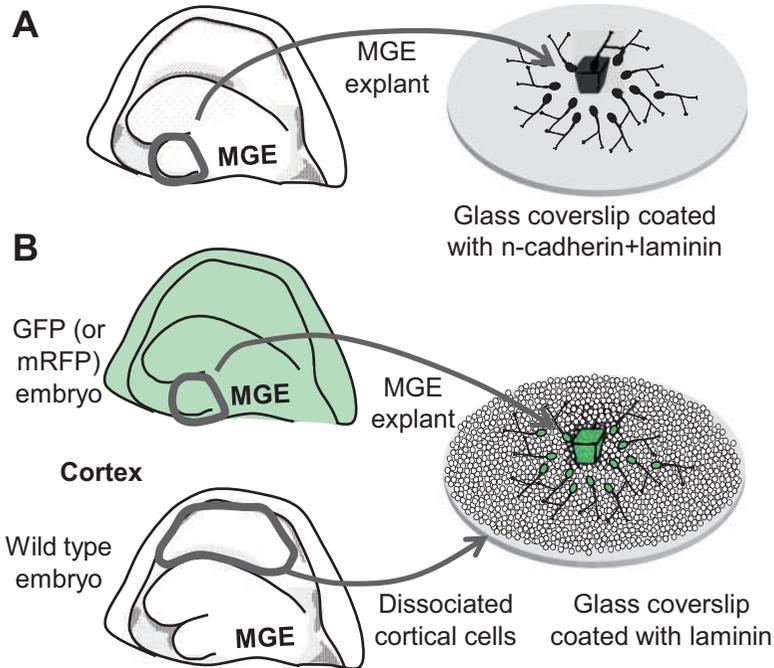
- (b) Transfer a culture dish stored in the CO<sub>2</sub> incubator on the stage of the binocular microscope. Carefully aspirate the 6/8 MGE explants in a cone with a small volume of dissection medium. These small explants dissociate at the liquid/air interface. To make sure that explants stay in liquid, aspirate first a small amount of dissection medium in the cone before collecting them. Then deliver explants in the Complete Culture Medium filling the small well above the coated coverslip without touching it. Distribute the explants over the coverslip using the tungsten needles. With the noncutting bent part of the tungsten needle, gently press each explant to make it adhere to the coverslip. Quickly and carefully transfer the dish in the incubator at 37 °C. The explants should not detach when you move the dish to the incubator (*see Note 10*).
- (c) Do not move the dishes for at least 1 h. Proceed the same for all MGEs. Interneurons usually start migrating out of the explant after 4–6 h in culture (*see Notes 11* and *Fig. 3a*).

### **3.3 Protocol 2: Culture of MGE- Derived Interneurons Migrating on Dissociated Cortical Cells**

#### **3.3.1 Coating: Laminin**

*As in Subheading 3.2.1, all the steps should be done in sterile conditions under a laminar flow hood. Let coating proteins thaw in the fridge before use.*

1. *The night before the dissection, coat with poly-L-lysine (PLL)*  
Same protocol as in Subheading 3.2.1, **step 1a** except the duration of the incubation: here, incubate PLL overnight in a CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C.
2. *The morning of the dissection, coat with laminin (LN)*
  - (a) Aspirate the PLL solution, and rinse the coverslip three times with sterile water. Let the coverslip dry under the laminar flow hood at least 30 min, boxes open.
  - (b) Dilute the stock LN at a final concentration of 20 µg/mL in F12/DMEM. Put approximately 150 µL of LN solution on each coverslip to cover it. Close the box and incubate 3 h (no longer than 4 h) in the CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C. Start the dissection (*see Subheading 3.3.2*) during this incubation time.
  - (c) Aspirate the LN solution and replace it with 200 µL of Complete Culture Medium. At this point the coverslip should never dry. Let the boxes wait at 37 °C until dissociated cortical cells are ready to be plated.



**Fig. 3** In vitro models to analyze the migration of MGE-derived interneurons. Schemes on the left show the ventricular side of telencephalic vesicles dissected from E12.5/E13.5 mouse embryos. Schemes on the right illustrate the distribution of MGE cells that migrated away from a MGE explant after several hours in culture. In **a** (Subheading 3.2), the MGE explant was cultured on a glass coverslip coated with adhesive proteins. In **b**, (Subheading 3.3), the MGE explant was cultured on a glass coverslip coated with laminin and covered by a monolayer of dissociated cortical cells

### 3.3.2 Dissection and Culture (See Fig. 2)

*These cocultures should be performed with fluorescent MGEs and non-fluorescent cortical cells, or with MGEs and cortex expressing two different fluorophores.*

*To minimize the use of animals, we take embryos at stage E13.5 from Swiss female mated with a heterozygote transgenic male expressing either the GFP or the mRFP under the control of the ubiquitous pCAG promoter. The MGEs are collected in fluorescent brains and the substrate of dissociated cortical cells is prepared with nonfluorescent brains (see Fig. 3b).*

*Alternatively, we can also use fluorescent embryos expressing two different fluorophores for cortical cells and MGE donors, or wild type and fluorescent mutant embryos for cortical cells and MGE donors. These experiments can also be done with cortical flaps collected at E13.5 and MGEs at E12.5. In all cases, the embryos of the two distinct litters are dissected successively the same day (See Note 12).*

#### 1. Embryonic brain dissection.

- (a) Prepare petri dishes and tools as explained in Subheading 3.2.2, step 1a.

- (b) Collect embryos as explained in Subheading 3.2.2, **step 1b** in 100 mm petri dishes filled with cold dissection medium. If using two different litters, use one dish per litter and write their name below each petri dish with permanent ink.
- (c) In the culture room, transfer the uterine horns in a 100 mm petri dish filled with clean cold dissection medium. Dissect uterine horns and collect the head of embryos as explained in Subheading 3.2.2, **step 1c**. Check fluorescence in embryos using an inverted fluorescent microscope (or a fluorescent binocular microscope) and sort fluorescent and nonfluorescent heads in distinct, labeled, petri dishes.
- (d) Extract brains as explained in Subheading 3.2.2, **step 1d**. Transfer the dissected brains in 60 mm petri dishes with clean cold dissection medium. Keep fluorescent and non-fluorescent brains separated in two distinct annotated petri dishes.

## 2. MGE dissection (*fluorescent brains*)

- (a) Dissect MGEs from fluorescent brains, following the same protocol as described in Subheading 3.2.2, **steps 2a** and **2b** (*see Fig. 2*).

## 3. Cortex dissection and dissociation of cortical cells (*nonfluorescent brains*)

*Cortices dissected from 2 or 3 vesicles provide enough dissociated cells to prepare the substrate of one coverslip. Overall, 12 brains at E13.5 are enough to prepare 8 culture dishes for videomicroscopy.*

- (a) Dissect the nonfluorescent brains as explained in Subheading 3.2.2, **steps 2a** and **2b** in order to detach from each telencephalic vesicle the lateral wall that contains the dorsal cortical anlage and the GEs (*see Fig. 2b*). Turn each lateral wall with the ventricular surface up, and make a cut with the bent end of the tungsten needle, at the frontier between the cortical anlage and the lateral GE. Stop before sectioning the meninges, and peel off the cortex from the meninges by moving the needle away from the lateral GE. Transfer the flaps of cortex using a sterile plastic pipette in a 35 mm petri dish filled with clean cold dissection medium.
- (b) Just before mechanical dissociation, re-section the large flaps of cortex into smaller pieces (0.5–1 mm in size) with the tungsten needles. Under the laminar flow hood, transfer these small pieces with dissection medium in a 2 mL eppendorf tube using a sterile plastic pipette. Let cortical pieces sediment. Aspirate the dissection medium and add 1 mL of dissociation medium in the eppendorf. Pipette up and down at least ten times with a 1 mL cone to dissociate cortical cells. Then centrifuge 5 min at 800 rpm at 4 °C.

Remove the dissociation medium above the pellet. Add 500–1500  $\mu\text{L}$  of Complete Culture Medium, depending on the size of the pellet, and resuspend the cells.

- (c) Count the cells with a counting chamber and adjust the volume to have a concentration of 4000 cells/ $\mu\text{L}$ . Quickly remove the solution above the coverslip in the culture well and replace it with 200  $\mu\text{L}$  of cortical cell suspension (800,000 cells are deposited per coverslip) (*see* **Note 13**). Incubate at least 10 min at 37 °C in the CO<sub>2</sub> incubator to let cells sediment and attach to the coverslip. If necessary complete with 50–100  $\mu\text{L}$  of Complete Culture Medium and culture cortical cells for at least 2 h before placing the MGE explants.

#### 4. Culture

- (a) Each culture well will contain all the explants from a single MGE. Just before putting the MGE in culture, section it in 6/8 pieces as explain in Subheading 3.2.2, **step 3a** (*see* Fig. 2d) and transfer the explants in the culture medium above the cellular substrate as explained in Subheading 3.2.2, **step 3b**. Distribute evenly the explants by picking them up with the sharp tip of the tungsten needle, and moving them above the cortical cells, without touching them. Then gently press each explant with the bent part of the tungsten needle, to make them adhere to the substrate, and carefully move the culture dish in the CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C. Usually, MGE explants adhere less efficiently on dissociated cortical cells than on synthetic substrates.
- (b) Do not move the dishes for at least 1 h. Proceed the same for all MGEs. Interneurons usually start migrating out of the explant after 12–18 h in culture (*see* **Note 10** and Fig. 3b).

### 3.4 Live Cell Imaging by Time-Lapse Videomicroscopy

*The videomicroscope should be warmed several hours in advance (10–12 h) to work on a thermally stable system the day of the experiment.*

*When the interneurons start migrating out of the explant:*

1. Carefully replace the Complete Culture Medium by pre-warmed Complete Video Culture Medium under a laminar flow hood: aspirate half of the volume of culture medium and replace it by the same amount of Complete Video Culture Medium (the culture should never dry). Repeat the process five times until the red color of the Complete Culture Medium is no longer visible.
2. Distribute 1 mL of Video Culture Medium along the lateral wall in the culture dish, in order to saturate the atmosphere and prevent the culture from drying. This medium should not mix with the culture medium in the culture well.

3. Close the dish and seal it with a thin band of Parafilm. Carefully clean the outside of the coverslip with ethanol.
4. Transfer carefully the culture dish on the stage of an inverted videomicroscope equipped with a spinning disk and a stage motorized in X,Y,Z. Wait at least 1 h before starting acquisitions. MGE explants cultured on a synthetic substrate are imaged each 1 or 2 min using phase contrast microscopy. MGE explants cultured on dissociated cortical cells are imaged each 3–5 min using confocal fluorescent microscopy. Cells can be imaged with 20 $\times$ , 40 $\times$  or 63 $\times$  objectives. We usually images 10–15 fields per culture. Z-stacks comprise 7–11 planes separated by 0.5 or 1  $\mu\text{m}$ , depending on magnification.

---

## 4 Notes

1. To prepare smaller culture wells, or 2 wells in the same dish, it is possible to drill two holes of 11 mm diameter in the bottom of the plastic dish, 5 mm apart from each other, and to seal 14 mm coverslips over each hole. The volume of coating solutions, the number of dissociated cortical cells, and the volume of culture medium have then to be adapted.
2. The coverslips can also be sealed with a mix of Vaseline and paraffin (ratio 1:3 w/w, *see* ref. 14). Etch the external surface of the plastic dish around the hole with sandpaper. Warm up the Vaseline–paraffin on a hot plate to melt it. Put four little drops of the Vaseline–paraffin mix around the hole, on the external side of the dish, with a warmed glass Pasteur pipette. Center a clean glass coverslip on the hole and press it gently on the drops to adhere. Then turn the bottom of the box on the hot plate. The Vaseline–paraffin drops will melt and spread between the glass and the plastic to seal the coverslip on outside of the dish. Adapt the volume of the drops to avoid overflow of Vaseline–paraffin inside the hole on the glass coverslip.
3. The treated coverslips and culture video boxes can be prepared in advance and stored for weeks. Just clean the boxes again in ethanol the day before the experiment.
4. The nature and the quality of the coating are crucial in these experiments.

We can use three different types of coating: a mixed substrate of laminin/Ncad for the cultures of MGE explants (described in Subheading 3.2), a pure substrate of laminin for the cocultures of MGE explants on dissociated cortical cells (described in Subheading 3.3), or a pure substrate of Ncad for the cultures of MGE explants. The pure substrate of Ncad (1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) is prepared according to the protocol described in Subheading 3.2 except that the laminin is removed and the

PLL at 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  is incubated with the anti hFc at 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  overnight at 4  $^{\circ}\text{C}$ .

MGE cells cultured on a pure substrate of laminin are well polarized but do not migrate long distances, and tend to form chains. On the substrate of pure recombinant Ncad, the motility of MGE cells is activated but cells are no longer directional as detailed in ref. 10. The mixed substrate of laminin and Ncad is used to promote a directed and active migration. Varying concentrations of laminin and Ncad have been tested and we have found that a substrate made of laminin 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and Ncad 0.25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  is a good compromise to observe an active and directional migration of MGE cells.

5. It is possible to use less coating proteins by putting a drop of approximately 50  $\mu\text{L}$  in the center of the coverslip. However, in this case, be careful that the drop does not touch the edges of the wall when moving the box, otherwise a meniscus will form, leaving the center of the coverslip dry and preventing a correct coating. We use an excess of PLL whose incubation time can vary. However, it should not be shorter than 3 h, and should not exceed overnight.
6. The drying step of PLL is mandatory.
7. The recombinant N-cadherin is a fusion between the extracellular domain of N-cadherin and the human Fc receptor [15]. Therefore, the N-cadherin coating comprises two successive steps: (1) incubation with IgG anti human Fc, (2) incubation with N-cadherin.
8. After killing the pregnant mice, the dissection of embryos has to be done as quickly as possible. The petri dishes containing the heads, brains and brain pieces should be stored on ice during waiting periods. The harvesting and dissection of the brains is performed under a binocular dissection microscope equipped with a very good optic, and installed in a clean and quiet part of the culture room. Dissecting brains and explant under a hood did not improve the quality of our short-term cultures.
9. This type of cutting ensures that all explants contain the same structures (primary and secondary proliferative zones) in order to reduce variability as much as possible.
10. This step is tricky and may require some training. Press the explants enough to avoid detachment when moving the box, but do not destroy them. Putting a small volume of Complete Culture Medium in the well can help to minimize flow movements during the transfer to the incubator and to keep explants attached.
11. After a few hours in culture, the explants will reorganize with the proliferating cells located at the periphery. Postmitotic cells exit from the bottom of the explant. Exit time can vary accord-

ing to the coating conditions, dissection time, strain/genotype/age of the mouse used.

12. The two experimental models described in this paper were designed to analyze the migration of MGE-derived interneuron precursors (*see* Fig. 3). Each model presents specific advantages and drawbacks. The cultures of MGE explants on synthetic substrates are much faster to prepare than the cocultures, and can be performed with any kind of mouse embryos, whereas the MGEs cultured on the dissociated cortical cells have to express a fluorescent marker. The two models moreover differ by the lifetime of the preparation. On the synthetic substrate, the migration of MGE cells stops after 1 day of culture, whereas the migration of MGE cells on the cortical substrate can last more than 3 days. In addition, the migratory behavior of MGE cells on the cortical cells strongly resembles the migratory behavior of MGE cells in organotypic brain slices. Finally, the cultures performed on a synthetic substrate are compatible with phase-contrast videomicroscopy and immunocytochemistry analyses are easier to perform.
13. The dissociated cortical cells quickly sediment in the eppendorf. Homogenize the suspension before pipetting the 200  $\mu$ L to deposit in the culture well.

## References

1. Marín O, Valiente M, Ge X, Tsai LH (2010) Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(2):a001834
2. Price J, Thurlow L (1988) Cell lineage in the rat cerebral cortex: a study using retroviral-mediated gene transfer. *Development* 104(3):473–482
3. Walsh C, Cepko CL (1988) Clonally related cortical cells show several migration patterns. *Science* 241(4871):1342–1345
4. O'Rourke NA, Dailey ME, Smith SJ, McConnell SK (1992) Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science* 258(5080):299–302
5. Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278(5337):474–476
6. Fode C, Ma Q, Casarosa S, Ang SL, Anderson D, Guillemot F (2000) A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev* 14(1):67–80
7. Marin O (2012) Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 13(2):107–120
8. Martini FJ, Valiente M, López Bendito G, Szabó G, Moya F, Valdeolmillos M, Marín O (2009) Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. *Development* 136(1):41–50
9. Britto JM, Johnston LA, Tan SS (2009) The stochastic search dynamics of interneuron migration. *Biophys J* 97(3):699–709
10. Luccardini C, Hennekinne L, Viou L, Yanagida M, Murakami F, Kessaris N, Ma X, Adelstein RS, Mège RM, Métin C (2013) N-cadherin sustains motility and polarity of future cortical interneurons during tangential migration. *J Neurosci* 33(46):18149–18160
11. Luccardini C, Leclech C, Viou L, Rio JP, Métin C (2015) Cortical interneurons migrating on a pure substrate of N-cadherin exhibit fast synchronous centrosomal and nuclear movements and reduced ciliogenesis. *Front Cell Neurosci* 9:286
12. Bellion A, Baudoin JP, Alvarez C, Bornens M, Métin C (2005) Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J Neurosci* 25(24):5691–5699
13. Fishell G, Blazeski R, Godement P, Rivas R, Wang LC, Mason CA (1995) Tracking fluores-

- cently labeled neurons in developing brain. *FASEB J* 9(5):324–334
14. Gregory WA, Edmondson JC, Hatten ME, Mason CA (1988) Cytology and neuron-glia apposition of migrating cerebellar granule cells in vitro. *J Neurosci* 8(5):1728–1738
  15. Lambert M, Padilla F, Mège RM (2000) Immobilized dimers of N-cadherin-Fc chimera mimic cadherin-mediated cell contact formation: contribution of both outside-in and inside-out signals. *J Cell Sci* 113(Pt 12): 2207–2219



Travail annexe (article publié)

## Les interneurones en migration sur un substrat pur de N-cadhérine montrent des mouvements centrosomaux et nucléaires rapides et synchronisés ainsi qu'une ciliogenèse diminuée.

« Cortical interneurons migrating on a pure substrate of N-cadherin exhibit fast synchronous centrosomal and nuclear movements and reduced ciliogenesis »

*Camilla Luccardini, Claire Leclech, Lucie Viou, Jean-Paul Rio and Christine Métin*

Au début de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de participer à un travail portant sur l'analyse des mouvements des interneurones en migration sur différents substrats de laminine ou N-cadhérine. En particulier, j'ai contribué à l'analyse de l'assemblage d'un cil primaire sur les interneurones dans ces différentes conditions de culture *in vitro*.

Une étude précédente du laboratoire avait déjà montré l'influence de la N-cadhérine *in vivo* et *in vitro* sur la migration des interneurones corticaux (Luccardini et al., 2013). *In vitro*, les cellules en migration sur un substrat pur de N-cadhérine montrent une motilité accrue, mais des défauts de polarisation en partie restaurés par l'ajout de laminine. Sur un substrat de laminine pur, les interneurones migrent lentement, mais présentent une morphologie plus polarisée, avec un prolongement de migration court et non branché. Sur ce substrat, de fortes interactions adhésives entre cellules sont observées, et les interneurones s'agrègent en fin de migration.

Sur un substrat de N-cadhérine, on observe régulièrement un ancrage du centriole mature du centrosome à la membrane plasmique. En revanche, les interneurones assemblent un cil primaire moins fréquemment dans cette condition que sur un substrat de laminine ou dans des co-cultures d'interneurones sur cellules corticales. Ces résultats montrent que les molécules adhésives dans l'environnement influencent l'élongation et/ou la stabilisation du cil primaire.

Par ailleurs, le centrosome reste proche du noyau dans les interneurones sur N-cadhérine, et les cellules montrent des mouvements rapides et synchronisés du centrosome et du noyau. A l'inverse, ces mouvements sont plus decorrélés sur un substrat de cellules corticales.



# Cortical interneurons migrating on a pure substrate of N-cadherin exhibit fast synchronous centrosomal and nuclear movements and reduced ciliogenesis

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Takeshi Kawauchi,  
Keio University School of  
Medicine/PRESTO, Japan

### Reviewed by:

Alfredo Cáceres,  
INEMEC-CONICET, Argentina  
Yves Jossin,  
University of Louvain Medical  
School, Belgium  
Masatoshi Takeichi,  
RIKEN, Japan

### \*Correspondence:

Christine Métin,  
INSERM, UMR-S839, 17 Rue du Fer  
À Moulin, 75005 Paris, France  
christine.metin@inserm.fr

### † Present address:

Camilla Luccardini,  
Université Claude Bernard Lyon 1,  
CGphiMC UMR CNRS 5534,  
Villeurbanne 69622, France  
camilla.luccardini@univ-lyon1.fr;  
Jean-Paul Rio,  
Institut du Cerveau et de la Moelle  
Epinière ICM-INSERM U 1127,  
Hôpital de la Pitié-Salpêtrière 47,  
Bd de L'Hôpital 75013 Paris, France  
jean-paul.rio@icm-institute.org

Received: 01 April 2015

Accepted: 13 July 2015

Published: 03 August 2015

### Citation:

Luccardini C, Lecléch C, Viou L,  
Rio J-P and Métin C (2015) Cortical  
interneurons migrating on a pure  
substrate of N-cadherin exhibit fast  
synchronous centrosomal and  
nuclear movements and  
reduced ciliogenesis.  
Front. Cell. Neurosci. 9:286.  
doi: 10.3389/fncel.2015.00286

Camilla Luccardini<sup>1,2,3†</sup>, Claire Lecléch<sup>1,2,3</sup>, Lucie Viou<sup>1,2,3</sup>, Jean-Paul Rio<sup>1,2,3†</sup> and Christine Métin<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> INSERM, UMR-S839, Paris, France, <sup>2</sup> Sorbonne Universités, UPMC University Paris 06, UMR-S839, Paris, France,

<sup>3</sup> Institut du Fer à Moulin, Paris, France

The embryonic development of the cortex involves a phase of long distance migration of interneurons born in the basal telencephalon. Interneurons first migrate tangentially and then reorient their trajectories radially to enter the developing cortex. We have shown that migrating interneurons can assemble a primary cilium, which maintains the centrosome to the plasma membrane and processes signals to control interneuron trajectory (Baudoin et al., 2012). In the developing cortex, N-cadherin is expressed by migrating interneurons and by cells in their migratory pathway. N-cadherin promotes the motility and maintains the polarity of tangentially migrating interneurons (Luccardini et al., 2013). Because N-cadherin is an important factor that regulates the migration of medial ganglionic eminence (MGE) cells *in vivo*, we further characterized the motility and polarity of MGE cells on a substrate that only comprises this protein. MGE cells migrating on a N-cadherin substrate were seven times faster than on a laminin substrate and two times faster than on a substrate of cortical cells. A primary cilium was much less frequently observed on MGE cells migrating on N-cadherin than on laminin. Nevertheless, the mature centriole (MC) frequently docked to the plasma membrane in MGE cells migrating on N-cadherin, suggesting that plasma membrane docking is a basic feature of the centrosome in migrating MGE cells. On the N-cadherin substrate, centrosomal and nuclear movements were remarkably synchronous and the centrosome remained near the nucleus. Interestingly, MGE cells with cadherin invalidation presented centrosomal movements no longer coordinated with nuclear movements. In summary, MGE cells migrating on a pure substrate of N-cadherin show fast, coordinated nuclear and centrosomal movements, and rarely present a primary cilium.

**Keywords:** migration, cortical interneuron, cytoskeleton, primary cilium, N-cadherin, electron microscopy, videomicroscopy

## Introduction

Cell migration, including neuronal migration, is described as a repetitive process comprising several steps (Ridley et al., 2003; Valiente and Marín, 2010): (i) cell polarization; (ii) leading process elongation; (iii) leading process stabilization through the formation of adherent junctions and/or adhesive contacts; (iv) forward displacement of organelles by forces anchored on adhesion sites; and (v) tail retraction. The whole process involves the capability of migrating cells to polarize and to interact with cues in their environment. Although adhesive interactions play a crucial role in cell migration, their role in the migration of embryonic neurons is not fully understood (Solecki, 2012). Recent studies have demonstrated a major role of N-cadherin mediated cell-cell adhesion in the radial migration of principal cortical neurons in the mouse embryo (Kawauchi et al., 2010; Franco et al., 2011; Jossin and Cooper, 2011). They showed that N-cadherin recycling controls the adhesion of migrating neurons to the radial glia, and that N-cadherin-mediated adhesion functionally interacts with the reelin signaling pathway to control transition steps at the beginning and at the end of the radial migration. Another study in young post-mitotic cortical neurons showed that N-cadherin enrichment at one pole determines the orientation of the polarity axis of the cell, on which the nucleus and centrosome thereafter position (Gärtner et al., 2012). Whether centrosome positioning organizes cell polarity or stabilizes a polarized organization resulting from interactions with extrinsic cues, is unclear in migrating cells of which the centrosome is most often positioned in front of the nucleus (Ueda et al., 1997; Solecki et al., 2004; Higginbotham and Gleeson, 2007; Yanagida et al., 2012).

In the developing forebrain, cortical GABAergic interneurons migrate long distances from the medial ganglionic eminence (MGE) and caudal ganglionic eminence (CGE) where they originate, to the cortex where they settle among principal cells and further differentiate (Anderson et al., 1997; Wichterle et al., 1999; Nery et al., 2002; Butt et al., 2005; Wonders and Anderson, 2006; Flames et al., 2007; Fogarty et al., 2007; Miyoshi et al., 2010). Maintaining the same direction of migration during a long journey toward their final target, is thus crucial for MGE and CGE cells (Marín et al., 2010). In a previous study, we examined whether N-cadherin contributed to the long distance migration of cortical interneurons, as previously demonstrated for precerebellar neurons (Taniguchi et al., 2006). We showed that N-cadherin ablation or invalidation in MGE cells delay the tangential migration of MGE cells and alter their capacity to colonize the cortical plate (Luccardini et al., 2013). Analyses in a co-culture model showed that MGE cells with N-cadherin invalidation exhibit reduced migration speed and abnormal cell directionality because nuclear movements frequently reversed.

N-cadherin is a homophilic cell-cell adhesion protein largely expressed by telencephalic cells on which MGE cells migrate *in vivo* (Kadowaki et al., 2007). To further understand how N-cadherin contributes to the motility and directionality of migrating MGE cells, we have compared the migration of MGE

cells on a pure substrate of N-cadherin, on a pure substrate of laminin that also influences cell migration and polarization (Kawauchi, 2012; Solecki, 2012), and on a substrate of cortical cells on which MGE cells exhibit their “*in vivo*-like” migration cycle. MGE cells migrated faster on the N-cadherin substrate than on any other substrate, and did not aggregate to each other. We have recently shown that the centrosome of MGE cells migrating on cortical cells can dock to the plasma membrane and assemble a primary cilium able to collect extrinsic information (Baudoin et al., 2012; Métin and Pedraza, 2014). We show here that the proportion of MGE cells with a primary cilium was strongly decreased on the N-cadherin substrate as compared with the proportion of ciliated MGE cells on the laminin substrate or on the substrate of cortical cells. Ultrastructural analyses surprisingly revealed that the mature centriole (MC) that assembles and anchors the primary cilium at the cell surface, docked to the plasma membrane at the same frequency in MGE cells cultured on N-cadherin, which rarely assemble a primary cilium, and in MGE cells cultured on cortical cells, which frequently assemble a primary cilium. In MGE cells migrating on the N-cadherin substrate, centrosomal and nuclear movements were fast and synchronous, and the centrosome preferentially localized near the nucleus. Finally, because MGE cells with an acute invalidation of N-cadherin presented centrosomal movements no longer coordinated with nuclear movements, we conclude that a pure substrate of cadherin promotes synchronous nuclear and centrosomal movements. Results moreover suggest that increased centrosomal motility does not impair the capacity of the MC to dock to the plasma membrane.

## Materials and Methods

### Animals

Pregnant Swiss mouse were purchased from Janvier Labs, and mouse embryos were produced in the animal facility of the laboratory by crossing wild type adults (Swiss, Janvier Labs). Experiments and animal care followed the European guidelines and were approved by the Ethical Committee Charles Darwin N°5 (E2CD5).

### Cell Cultures

#### Cell Cultures for Live Cell Imaging and Immunostaining

Cultures were performed on glass coverslips previously treated with nitric acid 67%, ethanol 100% and then sterilized in the oven and fixed with paraffin at the bottom of perforated petri dishes which were used as a culture chamber for the video microscopy experiments. For immunostaining, cultures were performed on glass coverslips placed in 4-well boxes.

#### Co-cultures of MGE explants on dissociated cortical cells

Cortices from wild type E13.5 mouse embryos were dissociated mechanically and the cortical cells were spread as a monolayer onto glass coverslips coated with poly-lysine and laminin (PLL/LN) as explained in Bellion et al. (2005). Cortical cells were cultured for 2 to 3 h in Dulbecco's Modified

Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) (1/1) supplemented with glucose, glutamax, penicillin/ streptomycin, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) buffer, N2 and B27 before placing the explants of MGE. MGEs dissected from E13.5 green fluorescent protein (GFP)-expressing transgenic mouse embryos were divided into four to six explants and placed on the substrate of dissociated cortical cells. MGEs electroporated as explained in Baudoin et al. (2012) with a plasmid encoding the pericentrin-AKAP-450 centrosomal targeting (PACT) domain of pericentrin fused to the mKO1 fluorochrome (*pCAG-PACT-mKO1*) or with a plasmid encoding the LifeAct-RFP construct (*pCAG-LifeAct-RFP*, Ibbidi) were cultured for 2–4 h for recovery before placing them in culture. To analyze centrosomal movements in cadherin invalidated MGE cells, MGE explants were co-electroporated with *pCAG-EGFP-N-cad(t)* and *pCAG-PACT-mKO1* plasmids as explained in Luccardini et al. (2013). Co-cultures were maintained in the culture medium described above for 24 h before time-lapse imaging.

### **Cultures of MGE explants on a protein substrate**

Clean and sterile glass coverslips were coated with PLL/LN to prepare the laminin substrate. Coverslips were coated with the extracellular domain of N-cadherin fused to the human Fc receptor protein (Lambert et al., 2000) as explained in Luccardini et al. (2013) to prepare N-cadherin substrate. Briefly, coverslips were incubated overnight at 4°C with 4 µg/ml poly-L-lysine (Sigma) and 4 µg/ml goat anti-human Fc antibody (Jackson ImmunoResearch). Coverslips were then washed in borate buffer and incubated with 1 µg/cm<sup>2</sup> purified N-cad-hFc chimera protein for 3 h at 37°C. To prepare N-cadherin/laminin substrate, 4 µg/ml Laminin (Sigma) was added to the PLL and goat anti-human Fc antibody. GFP-expressing MGE explants dissected from E13.5 transgenic mouse embryos, electroporated or not with a plasmid encoding the PACT-mKO1 fusion protein, were placed on the protein substrate, and cultured 2–24 h before imaging.

### **Cultures for Electron Microscopy**

#### ***Co-cultures of MGE explants on cortical axons***

Co-cultures were performed on plastic coverslips coated with PLL/LN as explained in Baudoin et al. (2012). Because MGE cells cannot be identified by fluorescent markers in co-cultures destined to Electron Microscopy (EM) studies, they were cultured on cortical axons on which they were identified by their morphology. On this substrate, MGE cells exhibit the same migration cycle as on dissociated cortical cells (Bellion et al., 2005). Cortical explants dissected from E13.5 wild type mouse embryos were cultured for 3–5 days in DMEM/F12 (1/1) supplemented with glucose, glutamax, penicillin/streptomycin, HEPES buffer, N2 and B27. When long and numerous axons extended away from cortical explants and covered most of the surface surrounding explants, the MGE was then dissected from E12.5 wild type mouse embryos and cut equally into four to six explants. Explants were placed at the tip of corticofugal axons and cultured for 36–48 h, in order to observe the migration of numerous MGE

cells on cortical axons. Co-cultures were then fixed in 1% paraformaldehyde, 1% glutaraldehyde in 0.12M PB/ 0.33 M sucrose at 4°C.

#### ***Cultures of MGE explants on a N-cadherin-Fc biomimetic substrate***

Plastic coverslips (Thermanox) coated with the N-cadherin substrate were prepared as explained for glass coverslips (see above). The MGE dissected from E12.5 wild type mouse embryos were cut in half and deposited on a coverslip. After 24 h in culture in the DMEM/F12 culture medium (see above), cultures were fixed as described above in 1% paraformaldehyde, 1% glutaraldehyde in 0.12M PB/ 0.33 M sucrose at 4°C.

### **Electron Microscopy**

#### **Preparation of Ultra-Thin Sections**

Cultures were post-fixed in 2% Osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) and contrasted with 1% uranyl acetate in maleate buffer. After dehydration in graded series of ethanol, cultures were transferred in araldite/ethanol (1/1) for 2 h and then overnight in 100% araldite. Small blocks with individual MGE cells migrating on either cortical axons or the N-cadherin substrate were isolated from the rest of the culture under a binocular microscope. These small regions were then embedded in a capsule of araldite with the plastic coverslip oriented parallel to the surface of the capsule. Ultra-thin sections (60 nm), parallel to the plastic coverslips, were collected on copper grids (Maxtaform Finder type H6, 200 mesh, Ted Pella Inc., Redding, CA, USA). Sections were contrasted with lead citrate solution.

#### **Data Analysis**

We selected several explants cultured on N-cadherin, which were surrounded by numerous migrating MGE cells (16 explants). An average of 6–11 grids were prepared with each culture. A total of 294 cells showing at least one centriole (30 grids, four independent cultures) were imaged, at minimum, at two different magnifications (×2000, ×20,000) with an ORIUS CCD camera (Gatan). In co-cultures performed on cortical axons, the density of MGE cells was strongly reduced compared to the density of MGE cells observed on the N-cadherin substrate. A total of 208 cells showing at least one centriole (98 grids, 10 independent cultures) were imaged and analyzed.

For each cell we measured the distance between the nuclear front and the centrosome, we characterized the plane of section of centriole(s) (transverse, longitudinal, oblique), and noted when centrioles were located within the leading process. The anchoring of the MC to the plasma membrane and the presence of ciliary structures (primary cilium, ciliary vesicle) at its distal end was also noted.

#### **Time-lapse Recording**

Time-lapse recording started 2–24 h after placement of explants on the laminin or N-cadherin substrate, and 24–36 h after placement of explants on the dissociated cortical cells. For time-lapse recording, the culture medium was replaced by a culture

medium without phenol red and with an increased concentration of Hepes buffer (20 mM instead of 10 mM). Co-cultures and cultures were imaged on an inverted microscope (Leica CTR 4000) equipped with a spinning disk (Roper Scientific, Trenton, NJ, USA) and a QuantEM 512SC camera (Photometrics). Cells were recorded using an X63 immersion objective, every 3 min, for an average of 4–5 h. Acquisitions were controlled using Metamorph software (Roper Scientific, Trenton, NJ, USA).

### Analyses of Recorded MGE Cells

Three independent culture experiments performed on each substrate of migration (dissociated cortical cells, laminin, N-cadherin, and N-cadherin/laminin) were analyzed in the present study. In experiments on cortical cells and N-cadherin, six to eight MGE cells exhibiting a correct expression pattern of PACT-mKO1 were selected for centrosomal and nuclear movement analysis in each experiment. In addition to its centrosome localization, the PACT construct was distributed throughout the cytoplasm and allowed for the identification of nuclear boundary. In experiments on laminin and N-cadherin/laminin, at least 15 cells were tracked in each experiment. Cell tracking was performed with either Metamorph or ImageJ (MTrackJ, NIH, USA).

### Statistics

Statistical analyses were performed using XLSTAT software. Mean values for a parameter in two independent samples were compared using the Student *t*-test. Distributions into classes were compared by non-parametric statistical tests: the test of Mann-Whitney for two classes, and of Kolmogorov-Smirnov for five classes.

### Immunostaining

Cultures were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.12M phosphate buffer/0.33 M sucrose at 4°C. Cells were incubated for 2 h with a blocking solution containing 0.25% Triton, 10% normal goat serum, 2% bovine serum albumin (BSA) in phosphate buffer saline (PBS). The following primary antibodies were used: mouse anti-Arl13b (1:1000; UC Davis/NIH NeuroMab Facility), rat anti-Tubulin YL1/2 (1:2000; abcam). Appropriate Alexa Fluor dye-conjugated secondary antibody (1:500; Invitrogen) was used to detect primary antibodies. Bisbenzimidazole (1:5000) was used for fluorescent nuclear counterstaining. Culture were mounted in Mowiol-Dabco and observed using an upright fluorescent microscope at X100 magnification (DM6000; Leica).

## Results

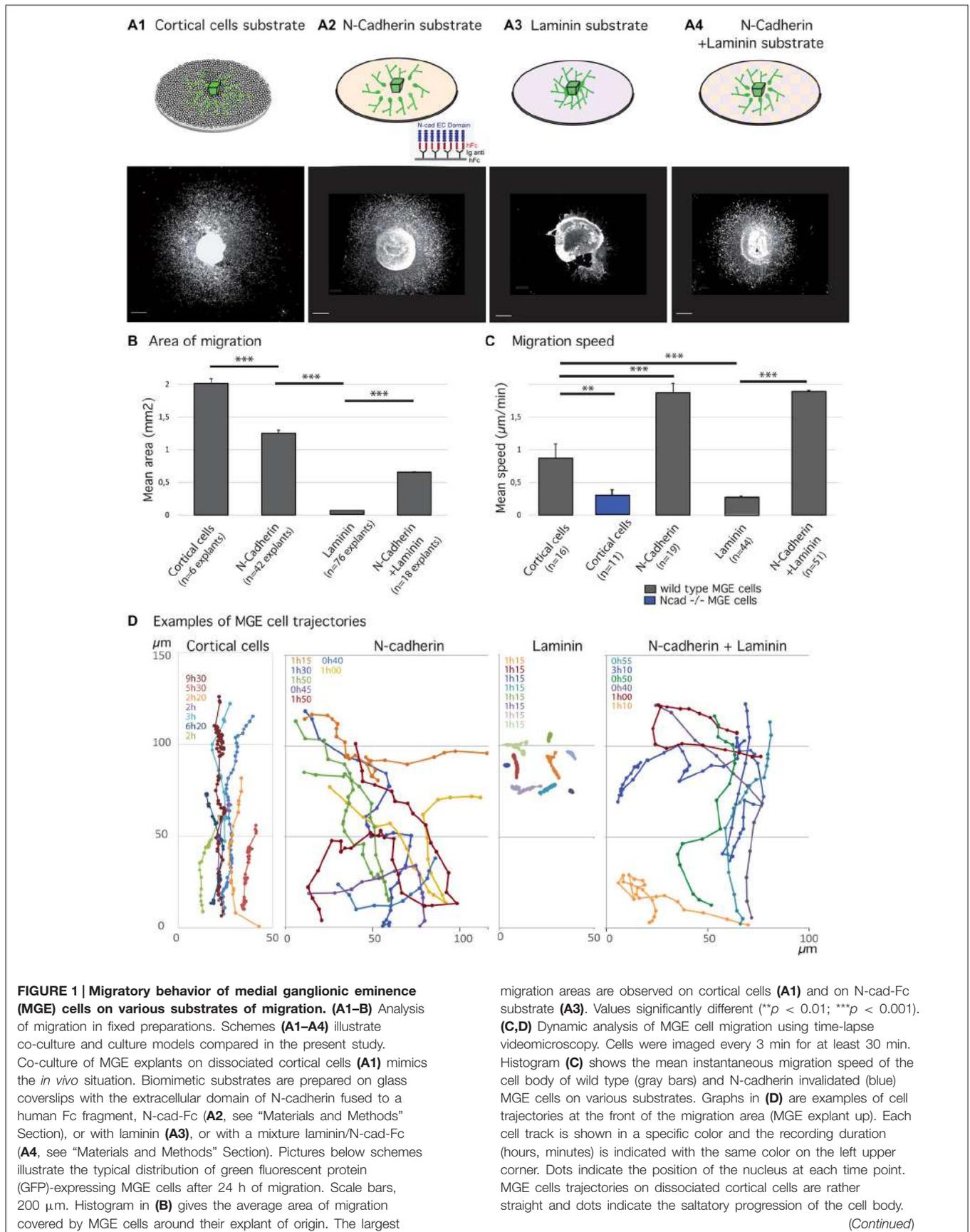
MGE cells contribute to 70% of cortical interneurons. We have previously shown that MGE cells exhibit the same migratory behavior in 3-dimensional organotypic cortical slices and on dissociated cortical cells (Bellion et al., 2005). When a piece of the MGE proliferative zone of a E12.5/E13.5 mouse embryo is placed on dissociated E13 cortical cells (see scheme in **Figure 1A1**), MGE cells exit the explant and migrate away with radially oriented trajectories. Cells present a polarized morphology with

the nucleus facing the explant and the leading process extending at the opposite side (Bellion et al., 2005). After 24–36 h in culture, MGE cells distribute over a large area around their explant of origin (picture in **Figure 1A1**). In these co-cultures, MGE cells present a saltatory migration characterized by coordinated nuclear and centrosomal movements. The centrosome migrates first toward the cell front and then, the nucleus translocates toward the centrosome. During the nuclear resting phase, the centrosome can migrate far away from the nucleus in close association with the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus (GA). We have recently shown that the MC of MGE cells can dock to the plasma membrane and organize a short primary cilium at the cell surface (Baudoin et al., 2012). About one third of MGE cells with the MC anchored to the plasma membrane have a primary cilium, making the MC a basal body. Plasma membrane anchoring could stabilize basal bodies and MCs, and thereby enhance the stabilization of MGE cell polarity.

We had previously shown that *N-cadherin* ablation and cadherin functional invalidation in MGE cells reduced cell motility and impaired cell polarization, identifying N-cadherin as an important cell-cell adhesion protein that controls the migration of cortical interneurons *in vivo* (Luccardini et al., 2013). Accordingly, MGE cells cultured on a biomimetic substrate of N-cad-Fc that consists of the extracellular domain of N-cadherin attached to a glass coverslips by the Fc receptor (Lambert et al., 2000) migrated actively. These observations confirmed that N-cadherin plays a unique role to control the migration of MGE cells as the extracellular domain of N-cadherin binds and activates N-cadherin receptors (Lambert et al., 2000). In particular, the motility of MGE cells was increased and the outgrowth of their leading process stimulated (Luccardini et al., 2013). Here, we first compared the motility and directionality of MGE cells cultured on a pure substrate of N-cadherin and on a pure substrate of laminin that binds integrin receptors and also controls cell polarity (Etienne-Manneville and Hall, 2003).

### Migratory Behavior of MGE Cells on Pure Substrates of N-Cadherin or Laminin

As already reported (Luccardini et al., 2013), MGE cells migrate much faster on the biomimetic substrate of N-cadherin than on the “*in vivo*-like” substrate of cortical cells (**Figure 1**). However, frequent directional changes and polarity reversals prevented MGE cells cultured on a pure N-cadherin substrate from colonizing larger areas than MGE cells cultured on cortical cells (**Figures 1B,D**). On a pure laminin substrate, in contrast, MGE cells migrated for very short distances around their explant of origin. After 24 h in culture, migrated MGE cells aggregated to each other to form short chains in which cells presented small amplitude forwards and backwards gliding movements (**Figure 2A**). When N-cad-Fc was added to the laminin substrate, MGE cells distributed over a significantly larger area that nevertheless remained inferior to the area covered by MGE cells on the pure N-cadherin substrate (**Figure 1**). On the mixed laminin/N-cadherin substrate, MGE cells showed fast migration speed and their trajectories were straighter than on



**FIGURE 1 | Migratory behavior of medial ganglionic eminence (MGE) cells on various substrates of migration. (A1–B)** Analysis of migration in fixed preparations. Schemes (A1–A4) illustrate co-culture and culture models compared in the present study. Co-culture of MGE explants on dissociated cortical cells (A1) mimics the *in vivo* situation. Biomimetic substrates are prepared on glass coverslips with the extracellular domain of N-cadherin fused to a human Fc fragment, N-cad-Fc (A2, see “Materials and Methods” Section), or with laminin (A3), or with a mixture laminin/N-cad-Fc (A4, see “Materials and Methods” Section). Pictures below schemes illustrate the typical distribution of green fluorescent protein (GFP)-expressing MGE cells after 24 h of migration. Scale bars, 200 µm. Histogram in (B) gives the average area of migration covered by MGE cells around their explant of origin. The largest

migration areas are observed on cortical cells (A1) and on N-cad-Fc substrate (A3). Values significantly different (\*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001). (C,D) Dynamic analysis of MGE cell migration using time-lapse videomicroscopy. Cells were imaged every 3 min for at least 30 min. Histogram (C) shows the mean instantaneous migration speed of the cell body of wild type (gray bars) and N-cadherin invalidated (blue) MGE cells on various substrates. Graphs in (D) are examples of cell trajectories at the front of the migration area (MGE explant up). Each cell track is shown in a specific color and the recording duration (hours, minutes) is indicated with the same color on the left upper corner. Dots indicate the position of the nucleus at each time point. MGE cells trajectories on dissociated cortical cells are rather straight and dots indicate the saltatory progression of the cell body. (Continued)

**FIGURE 1 | Continued**

N-cad-Fc, alone or associated with laminin, strongly activates cell motility. On pure N-cadherin, MGE cells frequently turn or invert (green, yellow curves) their direction of migration. Cells movements on laminin are very slow. MGE cells are unbranched and form chains (see **Figure 2A**) in which cell bodies move alternatively forth and back. Trajectories are most often straight. On N-cadherin/laminin, trajectories are straighter than on N-cadherin (blue, orange curves).

N-cad-Fc (**Figure 1C**). On the N-cadherin/laminin substrate, neighboring MGE cells transiently migrated along each other and some of them exhibited polarity reversals (see yellow track in **Figure 1D**). As a consequence, the migration area of MGE cells was slightly but significantly reduced when compared to the migration area of MGE cells on a pure N-cadherin substrate (**Figure 1B**).

The morphologies of MGE cells and their spatial distribution strongly differed on the pure substrates of N-cadherin and of laminin (**Figures 2A,B**). Cells migrating on laminin exhibited bipolar shapes with short unbranched leading and trailing neurites whereas cells migrating on the pure N-cadherin substrate extended several long neurites at cell front and a thinner trailing process. On laminin, migrating MGE cells adhered to each other on their whole length. After 1 day in culture, they preferentially formed chains, with the exception of a few isolated cells. On N-cadherin, MGE cells moved on each other but never aggregated.

Cell dynamics and cell interactions appeared thus opposite on the pure substrates of N-cadherin and laminin. Cell motility was increased on the substrate of pure N-cadherin and decreased on the substrate of pure laminin. Cell-cell contacts were strengthened on laminin, and weakened on N-cadherin. Cell contacts moreover influenced MGE cell trajectories and the size of the area colonized by migrating MGE cells.

### Primary Cilium Frequency in MGE Cells Migrating on N-Cadherin and on Laminin Substrates

MGE cells migrating on a pure N-cadherin substrate or on a pure laminin substrate, frequently reversed their direction of migration. We have proposed that the primary cilium protruding at the cell surface could help stabilizing the centrosome (Baudoin et al., 2012; Métin and Pedraza, 2014). We thus immunostained the primary cilium in MGE cells migrating on those pure protein substrates. Immunostaining revealed that a primary cilium was much less frequent on MGE cells migrating on a N-cadherin substrate than on MGE cells migrating on a laminin substrate (**Figure 2**). In contrast, the primary cilium was observed at similar frequencies on MGE cells migrating on the laminin substrate and on the “*in vivo*” like substrate of cortical cells (**Figures 2C,D**). This result shows that adhesion proteins distributed on the substrate of migration of MGE cells directly influenced the formation and/or the stabilization of their primary cilium, and that N-cadherin alone was unable to promote the assembly and/or the stabilization of the primary cilium. In contrast, we did not correlate the presence of a primary cilium with the capacity of migrating MGE cells to maintain a fixed polarity.

The primary cilium is assembled at the cell surface by the MC that docks to the plasma membrane. In order to determine whether the low frequency of primary cilia on MGE cells migrating on the pure N-cadherin substrate could result from a change in the subcellular positioning of the MC, we analyzed by EM the localization of the centrioles, especially the MC, in MGE cells migrating on the pure N-cadherin substrate. As a reference, the subcellular positioning of centrioles was analyzed in MGE cells migrating on the “*in vivo*-like” substrate of cortical axons (**Figure 3**).

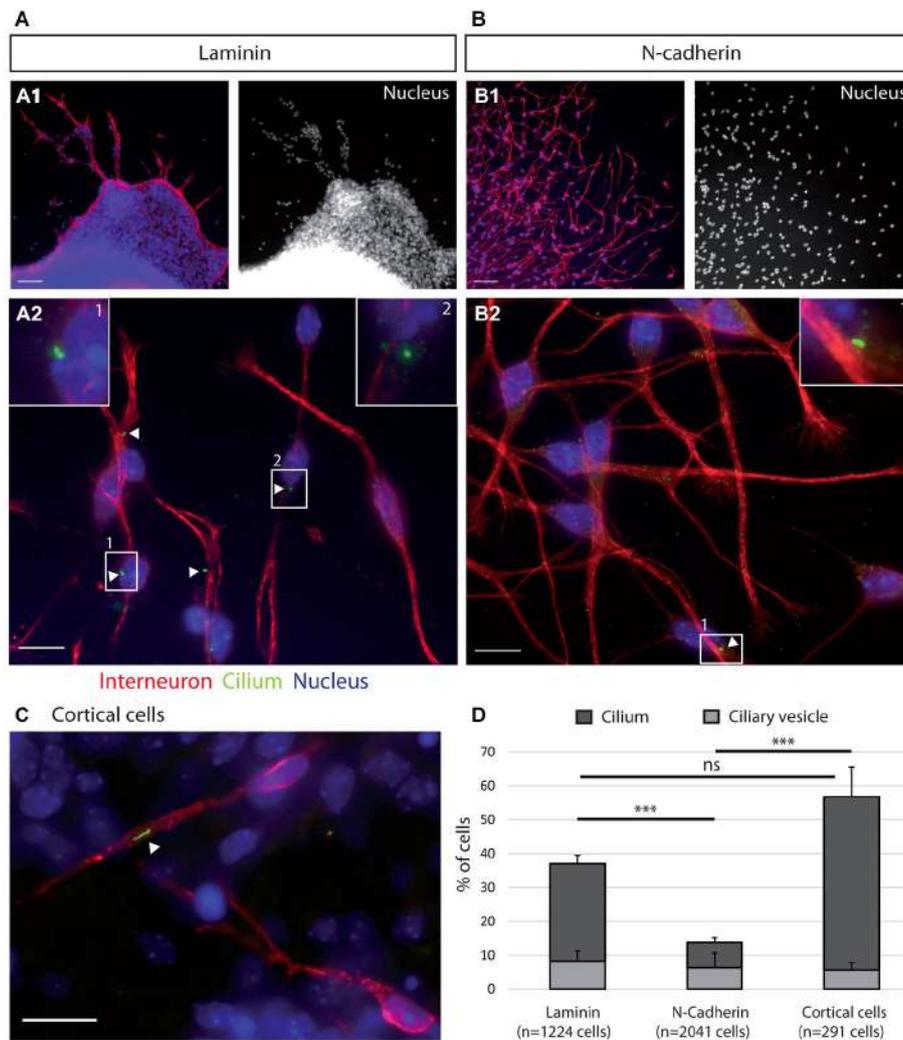
### Subcellular Localization of the Centrosome in MGE Cells Migrating on a N-Cadherin Substrate

Ultrathin sections were performed parallel to the surface of the coverslip in the plane of migration of MGE cells. Sections that comprised the cell body of MGE cells generally comprised a significant portion (up to 15  $\mu\text{m}$ ) of the neuritic processes extending from the cell body (**Figures 3A2,A2'**). A trailing process, much thinner than the leading process, was sometimes observed at the rear of the nucleus (black star in **Figure 3A2**). Depending on the phase of the migration cycle, the nuclear region, the cytoplasm and the leading process were either in continuity (**Figure 3A2**) or separated by constricted regions that identified the rostral swelling comprising the centrosome and the GA (**Figure 3A2**; Métin et al., 2008; Valiente and Marín, 2010). Our previous analyses (Bellion et al., 2005; Luccardini et al., 2013) showed that the GA was positioned at cell front in almost all MGE cells cultured on cortical axons.

MGE cells cultured on N-cad-Fc showed either a polarized morphology with a leading and a trailing process that differed in thickness and length (**Figure 3B2**) or a complex multipolar morphology (not illustrated). Multipolar MGE cells were few in our sample. The size of the cell body was increased on N-cadherin and a clear constriction between the nuclear compartment and the rostral cytoplasmic compartment was less frequently observed. The GA was most often located in the same compartment as the nucleus. Our previous studies showed that the GA was located at the rear of the nucleus in 30% of MGE cells cultured on N-cad-Fc (see histogram of **Figure 1G** in Luccardini et al., 2013).

We analyzed the centrosomal-nuclear distance in MGE cells ( $n = 213$ ) cultured on N-cad-Fc and in MGE cells ( $n = 208$ ) cultured on cortical axons as illustrated in **Figures 3C1–C3**. We defined 5 classes of distances between the centrosome and the nuclear edge facing the leading process, or the GA when the leading process was difficult to identify in ultrathin section (**Figure 3E**). In the present study, the nuclear edge facing the leading process or the GA was considered as the nuclear front in 100% of MGE cells migrating in cortical axons, and in only 70% of MGE cells cultured on N-cadherin. It was considered as the nuclear rear in the remaining 30% of MGE cells cultured on N-cadherin.

Surprisingly, the centrosome of MGE cells cultured on N-cad-Fc was less frequently located close to the nucleus (less than 2  $\mu\text{m}$  away) as compared to the centrosome of MGE cells cultured on cortical cells (24% compared to 40%, **Figure 3F**). On N-cad-Fc, the centrosome was most often located at a



**FIGURE 2 | Ciliogenesis in MGE cells depends on the substrate of migration. (A–C)** Cells that migrated away from MGE explants on a glass coverslips coated with either laminin **(A)** or N-Cad-Fc **(B)** were immunostained for the ciliary protein Arl13b (green, white arrow heads) and for tyrosinated tubulin, a marker of dynamic microtubules (red). **A1** (resp. **B1**) are low magnification views of the cultures illustrated in **A2** (resp. **B2**). MGE cells migrating on cortical cells **(C)** were electroporated with LifeActRFP plasmid (red) and immunostained for the ciliary protein Arl13b (green, white arrow head). Arl13b antibodies label either small

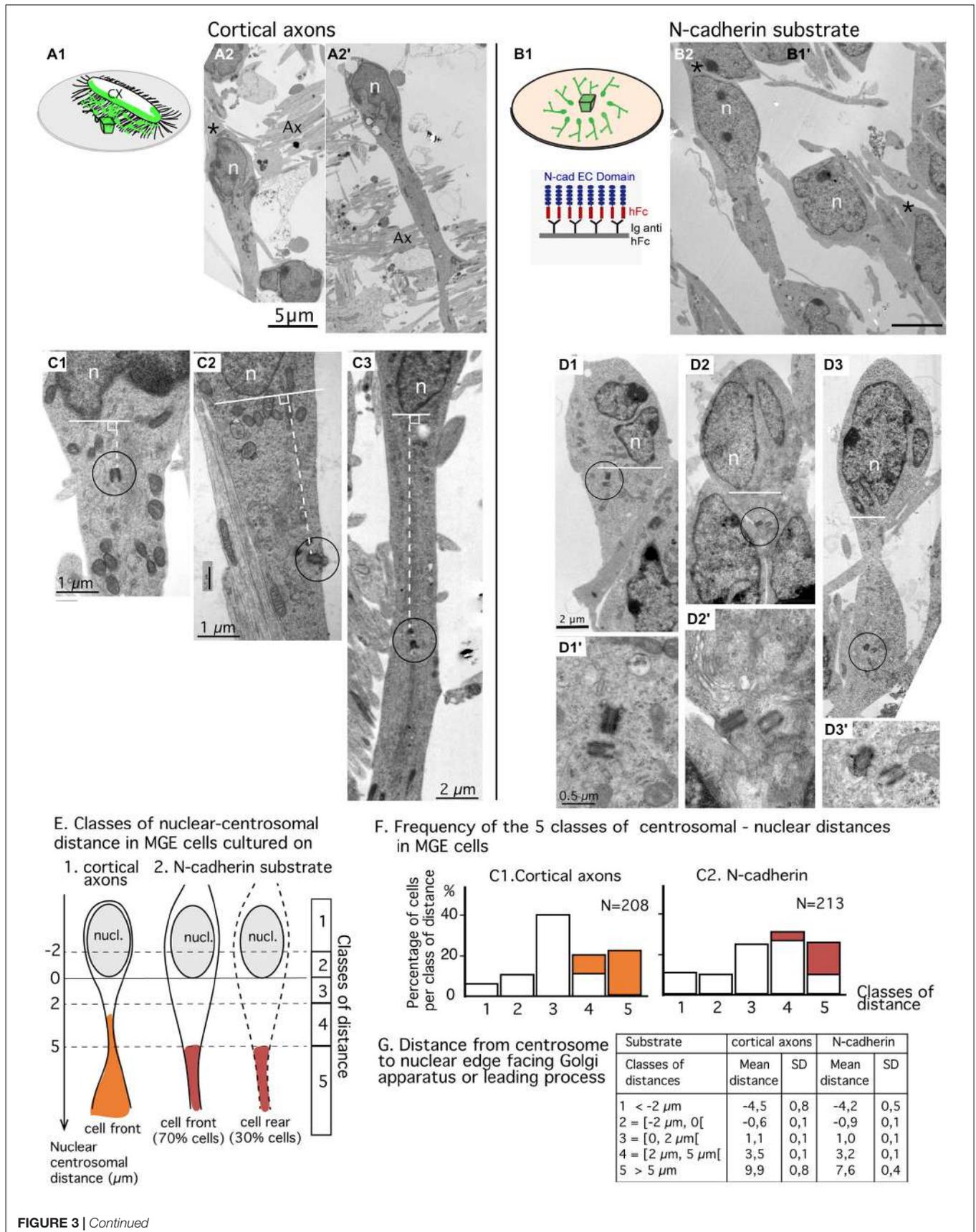
dots [diameter  $<0.5 \mu\text{m}$ , see enlarged insert 2 in panel **(A)**] or longer primary cilia [length  $>0.5 \mu\text{m}$ , see enlarged inserts 1 in panels **(A,B)**]. Nuclei are labeled with DAPI (blue). Scale bars:  $100 \mu\text{m}$  **(A1,B1)**,  $10 \mu\text{m}$  **(A2,B2)**. **(D)** Percentage of ciliated MGE cells on laminin, N-cadherin and in co-cultures. Bars show the percentages of MGE exhibiting an Arl13b positive dot (“ciliary vesicle” in legend, light gray) and a primary cilium (Arl13b positive structure longer than  $0.5 \mu\text{m}$ , dark gray). Error bars represent standard error of the mean (SEM). Mean values were compared using a *t*-test ( $***p < 0.001$ ; ns, non significantly different).

distance between  $2\text{--}5 \mu\text{m}$  from the nucleus, either at nuclear front or rear. Interestingly, in MGE cells cultured on cortical axons, the centrosome was able to escape the small perinuclear region and migrated into the leading process. Accordingly, the longest nuclear-centrosomal distances were observed in MGE cells cultured on cortical axons (mean value,  $9.9 \mu\text{m}$ , table in **Figure 3G**) rather than in MGE cells cultured on N-cad-Fc (Table in **Figure 3G**, mean value  $7.6 \mu\text{m}$ , significantly different by a *t*-test,  $p = 0.0053$ ). These results show that the centrosome of MGE cells migrating on pure N-cadherin distributed in a perinuclear domain significantly larger than in MGE cells cultured on cortical axons. However, on N-cadherin,

the cytoplasm rarely formed a rostral swelling. We then examined whether the distribution of the centrosome in a rather large cytoplasmic compartment surrounding the nucleus affected the frequency to which the MC docked to the plasma membrane.

### Frequency of MC Docking to the Plasma Membrane in MGE Cells Migrating on N-Cadherin

The MC was detected in both MGE cells cultured on N-cad-Fc ( $n = 92$ ) and MGE cells cultured on cortical axons ( $n = 103$ ). In ultra-thin sections, the MC was sometimes accompanied by



**FIGURE 3 | Continued**

**Comparison of centrosomal position in MGE cells migrating on cortical axons vs. N-cadherin substrate using electron microscopy (EM) on ultrathin sections. (A1–B2)** MGE cells were cultured on either cortical axons (**A2,A2'**) as schematized in (**A1**) or N-cad-Fc (**B2**) as schematized in (**B1**). On these low magnification views of ultrathin sections, migrating MGE cells are polarized. Nuclei (n) are elongated on the polarization axis. A large process, likely the leading process, extends at one pole of the nucleus. No process (**A2'**) or a thin process resembling a trailing process (black stars in **A2,B2**) is observed at the opposite pole of the nucleus. Scale bars: 5  $\mu\text{m}$  in (**A2,B2**). (**C1–D3'**) Electron micrographs of MGE cells cultured on cortical axons (**C1–C3**) or on N-cad-Fc (**D1–D3'**) illustrate cells with different nucleus-centrioles distances: centrioles less than 2  $\mu\text{m}$  in front of the nucleus (**C1,D1**), more than 5  $\mu\text{m}$  away from the nucleus (**C3,D3**) or between 2 and 5  $\mu\text{m}$  (**C2,D2**). The centriole-nuclear distance was measured as shown in panels (**C1–C3**) (white dotted line). (**D1'–D3'**) are enlarged views of the encircled centriole pair in panels (**D1–D3**), respectively. Same scale in (**D1–D3**), and in (**D1'–D3'**), respectively. (**E–G**) Quantitative analysis. Scheme E defines the five classes of nuclear centrosomal distances used in the present study. The nuclear membrane facing the Golgi apparatus (GA) or the leading process defines the origin of measurements (0). Distances measured away from the nucleus, on the polarity axis of the cell, are positive. Negative centrosomal-nuclear distances were subdivided into two classes (1 and 2), whereas positive centrosomal-nuclear distances were divided into three classes (3–5). In cultures on N-cad, MGE cells with the centrosome located at the nuclear rear (about 30% of MGE cells, see text) were not distinguishable from cells with the centrosome located at nuclear front. Histograms in F show the proportion of MGE cells in each class of nuclear-centrosomal distance in co-cultures on cortical axons (**C1**) and in cultures on N-cad (**C2**). Orange and red bars identify cells in which the centriole was located in a process or in a cytoplasmic swelling, as illustrated in (**E**). (**G**) Table indicates the mean nuclear-centrosomal distance and the standard deviation in each class of distance.

a daughter centriole (**Figures 4A4,B1,B4**). Most often, the MC was isolated and identified by the presence of lateral appendages and/or distal structures such as a large vesicle or a primary cilium (**Figures 4A1,A3,A4,B1,B2,B3**). In some cells, the MC accumulated small vesicles at its distal end (**Figures 4A1,B2**). In MGE cells cultured on N-cad-Fc as well as on cortical axons, the MC was able to dock to the plasma membrane (**Figures 4A2,B3**). We counted very similar proportion of MC or basal bodies anchored to the plasma membrane in MGE cells migrating on either N-cad-Fc or cortical axons (26% and 32%, not significantly different by a test of Mann-Whitney,  $p = 0.67$ , **Figure 4C**).

We then examined whether the MC docked to the plasma membrane in a particular subcellular compartment. Analyses revealed that the centrosome could dock to the plasma membrane at any distance from the nucleus. Nevertheless, the MC most often docked to the plasma membrane in its preferred compartment of residency (see green bars in **Figure 4C2**: 50% of docked MCs were located 2–5  $\mu\text{m}$  away from the nucleus). In MGE cells cultured on cortical axons, the proportion of MCs docked to the plasma membrane was slightly biased toward the leading process (**Figure 4C1**: 30% of docked MCs, and 20% of undocked MCs, the difference is not significant by a Kolmogorov-Smirnov test).

According to the results in MGE cells immunostained for Arl13b (**Figure 2**), the proportion of MCs docked to the plasma membrane and associated with a primary cilium was two folds higher in MGE cells cultured on cortical axons (55%) than in MGE cells cultured on N-cad-Fc (27%). However, in this small sample, the difference is not significant by a Mann-Whitney test. It is noteworthy that MCs located into the cytoplasm associated with a large distal vesicle or small vesicles attached to distal appendages at the same frequency regardless of the substrate of migration (69 and 71% respectively, **Table D** in **Figure 4**). Therefore, the ability to assemble a primary cilium at the distal end of the MC was similar in both samples, showing that the interaction of MGE cells with a N-cad-Fc substrate of migration rather did not promote primary cilium elongation on the cell surface.

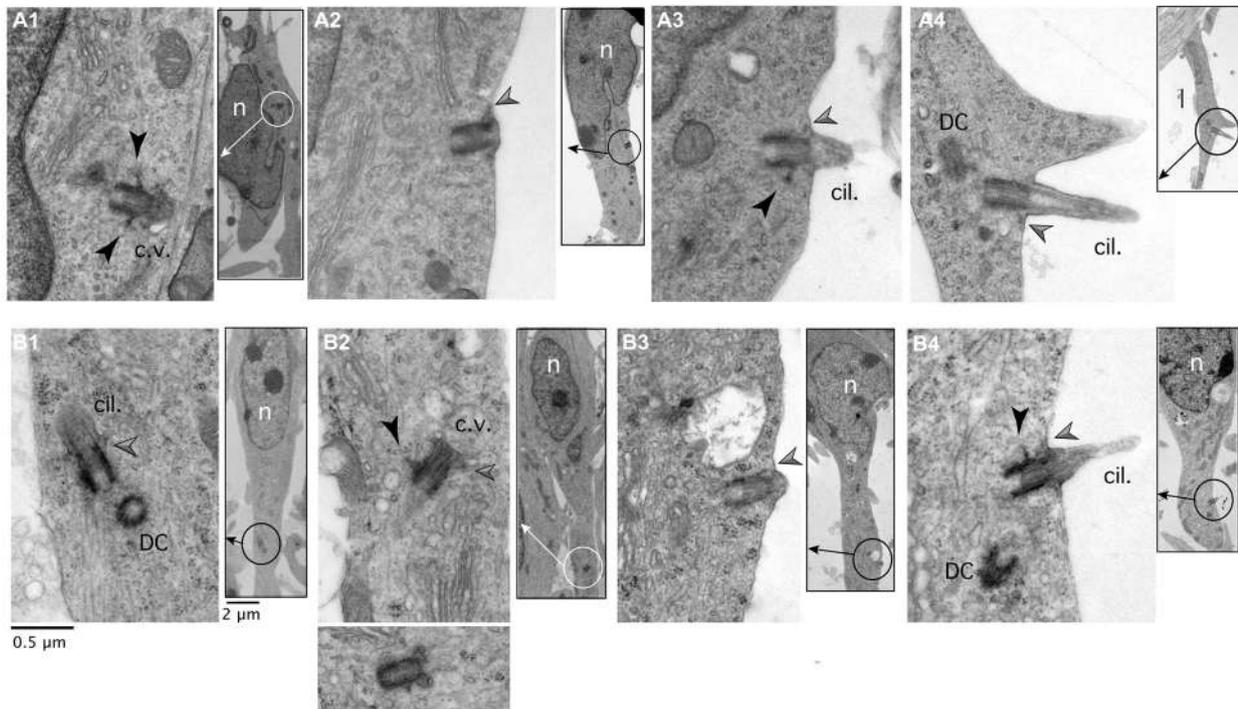
### Dynamic Behavior of the Centrosome in MGE Cells Migrating on a N-Cadherin Substrate

Our EM analysis revealed that the MC of MGE cells migrating on a N-cad-Fc substrate docked to the plasma membrane at the same frequency as the MC of MGE cells migrating on cortical axons. However, the subcellular distribution of the centrosome in MGE cells migrating on a N-cadherin substrate and on cortical axons strongly differed. We thus analyzed the dynamic behavior of the centrosome in MGE cells cultured on a pure N-cadherin substrate. MGE cells were electroporated with a PACT-mKO1 construct to label the centrosome and identify nucleus position (**Figure 5**).

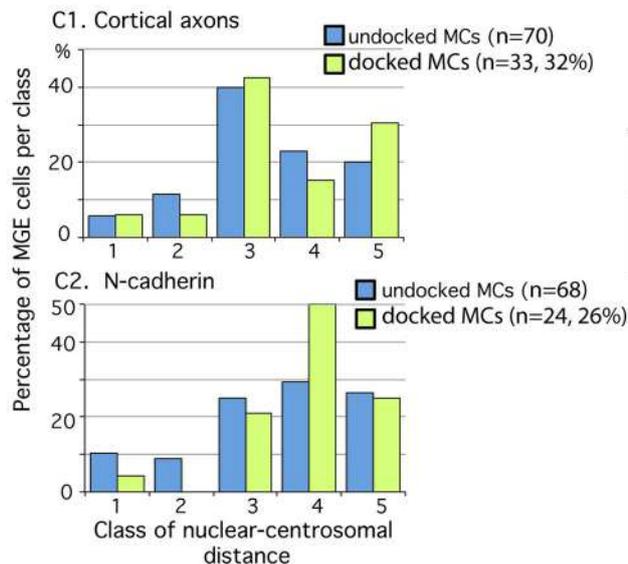
MGE cells migrating on N-cad-Fc alternated between straight and curved trajectories (**Figure 1D**) in correlation with their morphology. MGE cells with a bipolar shape followed straight trajectories (see panels 21–33 in **Figure 5A1**) whereas MGE cells with a multipolar shape continuously changed their direction of movements (see panels 3–15 and 39–51). The nucleus did not present resting phases (gray curves in **Figures 5A2,A3**) and the centrosome moved together with the nucleus (mean migration speed, 1.94  $\mu\text{m}/\text{min}$ ). The centrosome most often remained located at the same pole of the nucleus, even when the direction of migration reversed (pink arrow head in **Figure 5A1**, panels 39–45). The centrosome could also enter the leading process for very short duration. Nuclear centrosomal distance was maintained short (blue curves in **Figures 5A2,A3**, white bar in histogram **Figure 5D**) and the ratio between the mean instantaneous migration speed of the nucleus and of the centrosome was equal to 1 (1.05  $\pm$  0.09, white bar in histogram of **Figure 5F**). In summary, the nucleus and centrosome presented fast and synchronous movements.

Synchronized centrosomal and nuclear movements are rarely observed in MGE cells migrating *in vivo* or on a complex substrate of cortical cells (Baudoin et al., 2012; **Figures 5B1,B2**). The nuclear progression is saltatory (see the distribution of nuclear positions in **Figure 1D**, and peaks of nuclear speed on gray curve in **Figure 5B2**), whereas centrosomal movements are progressive, with smaller peaks of migration speed and faster forward movements between

**A,B.** Cytoplasmic and cell surface location of mature centrioles (MC) and basal bodies in MGE cells cultured on cortical axons (A1-A4) or on N-cadherin substrate (B1-B4)



**C.** Influence of the distance to the nucleus on the docking of the MC to the plasma membrane



**D.** Frequency of ciliary structures (primary cilium, cil., or ciliary vesicle, c.v.) associated with cytoplasmic MC and plasma membrane anchored MC or basal bodies

Nber of MC	Substrate			
	cortical axons		N-cadherin	
Pl. Memb.	20	12 cil. (60%)	15	4 cil. (27%)
cytopl.	28	20 c.v. (71%)	39	27 c.v. (69%)

**FIGURE 4 | Mature centriole (MC) subcellular localization and ciliogenesis in MGE cells cultured on cortical axons or N-cadherin. (A1-B4)** Panels show examples of MC with cytoplasmic localization (A1,B1,B2) or MC docked to the plasma membrane (A2-A4,B3,B4) in MGE cells cultured on cortical axons (A1-A4) and N-cad-Fc (B1-B4). Inserts on the right side of panels are low magnification views of cells to localize the MC (circle). MC sectioned longitudinally show lateral appendages (black arrow heads) and/or distal appendages (gray arrow heads) which attach ciliary vesicles to

the MC (B1,B2) or the MC to the plasma membrane (A2-A4,B3,B4). The cilium is often attached to a basal body decorated with a long lateral appendage (A3,B4). Same scale for all high magnification pictures and inserts (see B1). Cil., primary cilium; c.v., ciliary vesicle DC, daughter centriole; n, nucleus. (C) Histograms compare in MGEs cultured on either cortical axons or N-cad-Fc, the distribution of cytoplasmic MC (blue bars) and of MC docked to the plasma membrane (green bars) in the different classes of nuclear centrosomal (Continued)

**FIGURE 4 | Continued**

distances (see **Figure 3E**). **(D)** Table gives the number of MC observed in the cytoplasm or docked to the plasma membrane, which exhibited a clear ciliary structure (primary cilium, cil.; ciliary vesicle, c.v.). Results confirm that primary cilia are less frequent on MGE cultured on N-cad-Fc than on cortical axons.

peaks (pink curve in **Figure 5B2**). The nuclear-centrosomal distance shows large amplitude variations, ranging from 0 to 20  $\mu\text{m}$  (blue curve in **Figure 5B2**, and gray bar in histogram **Figure 5D**, significantly different from the white bar by a *t*-test,  $p = 0.009$ ). Nevertheless, centrosomal movements are coordinated with nuclear movements even if both organelles do not move synchronously. Accordingly, the ratio between centrosomal and nuclear mean instantaneous migration speeds was close to 1 in the present sample ( $1.1 \pm 0.2$ , gray bar in histogram **Figure 5F**). To further understand the contribution of cadherin mediated cell-cell adhesion in those centrosomal and nuclear movements, we electroporated MGE cells with a dominant negative construct (pCAG-N-cad(t)) that sequesters endogenous catenins and interferes with signaling pathways downstream cadherin (Taniguchi et al., 2006). As previously reported (Luccardini et al., 2013), the migration speed of the nucleus was drastically reduced in MGE cells with cadherin invalidation and cell polarity frequently reversed (**Figures 5C1,C2**, and blue bar in histogram **Figure 5E**). Surprisingly, the centrosome remained more motile than the nucleus, moving from one nuclear pole to the other. Accordingly, the ratio between centrosomal and nuclear instantaneous migration speeds increased to  $1.6 (\pm 0.8)$ , showing that cadherin invalidation in MGE cells partially disrupted the correlation between centrosomal and nuclear movements. This result suggests that cadherin activity promotes the synchronization of nuclear and centrosomal movements, which was indeed remarkably tight in MGE cells migrating on a pure N-cadherin substrate.

## Discussion

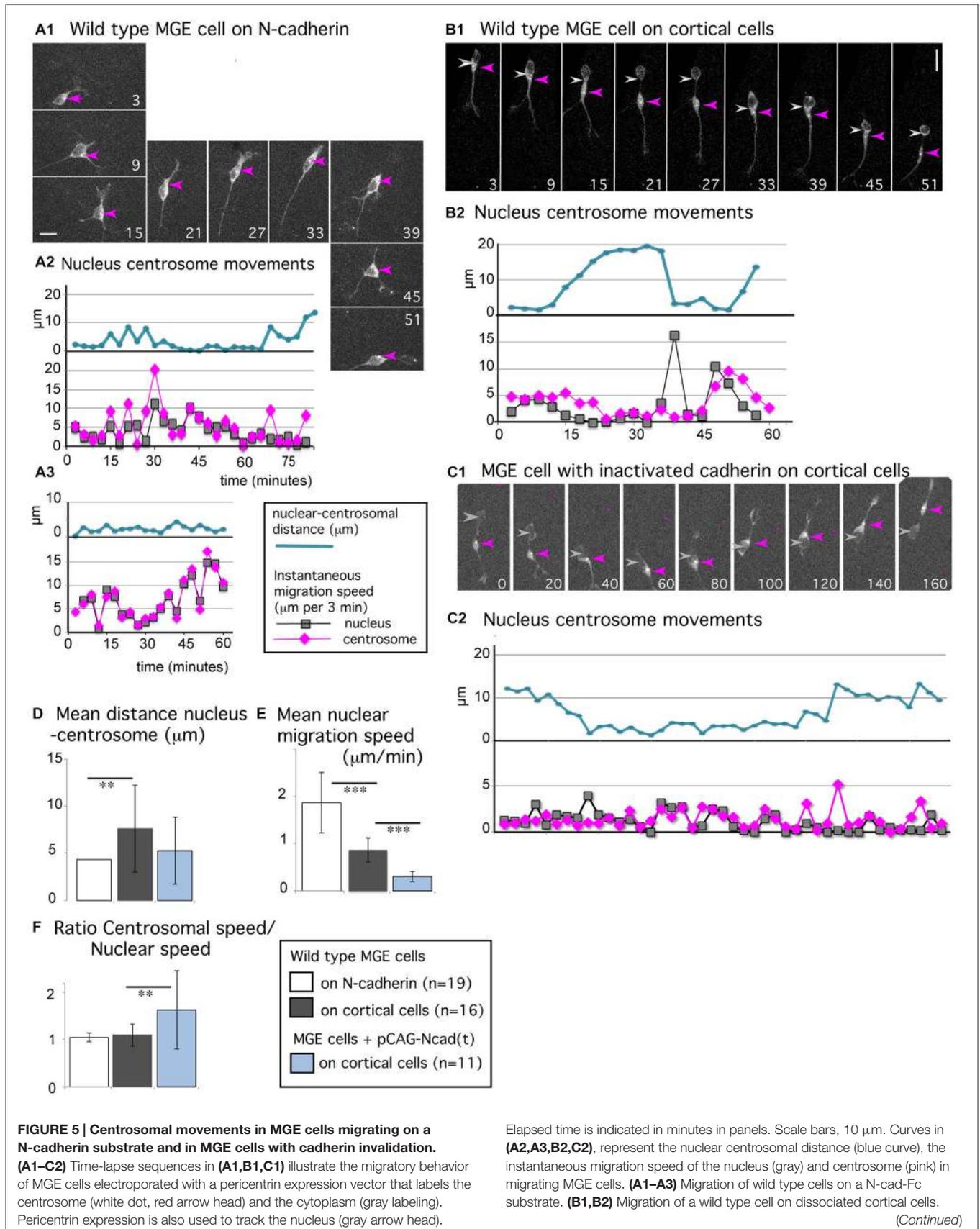
In the embryonic brain, N-cadherin is present with other adhesive and guidance cues in the migratory pathway of MGE cells. Because we observed that N-cadherin was the most efficient protein substrate to promote the migration of MGE cells *in vitro*, we decided to further characterize the migratory behavior of MGE cells on this permissive substrate. We moreover compared the migration of MGE cells on a pure N-cadherin substrate with their migration on a pure laminin substrate. The migration speed of MGE cells was very slow on the pure laminin substrate and cells preferentially adhered to each other. On N-cadherin in contrast, contacts between MGE cells were minimal. Centrosomal movements were highly synchronized with nuclear movements. The MC remained able to dock to the plasma membrane but a primary cilium rarely formed. Therefore, cadherin signaling not only influences nuclear motility in migrating MGE cells, but moreover influences centrosomal movements and ciliogenesis.

## Migratory Behavior of MGE Cells on a Pure Substrate of N-Cadherin or of Laminin

Two major types of cell adhesion regulate the cell migration: (1) cell-cell adhesion that is controlled, among other proteins, by classical cadherins that establish homophilic interactions; and (2) cell-extracellular matrix adhesion that is controlled, among others, by integrin receptors that link extra-cellular matrix (ECM) proteins as laminin or fibronectin to the actin cytoskeleton (Kawauchi, 2012). N-cadherin is expressed by MGE cells and by cells in their migratory pathway (Kadowaki et al., 2007). We previously showed that N-cadherin loss of function in migrating MGE cells altered cell motility and cell polarity (Luccardini et al., 2013). To further characterize the role of N-cadherin mediated cell-cell adhesion in the migration of cortical interneurons, we analyzed the migratory behavior of MGE cells on a biomimetic substrate of N-cadherin and on a pure laminin substrate that activates integrins, a class of cell surface receptors involved in neural migration and cell polarity (Lawson and BurrIDGE, 2014). In contrast to laminin on which MGE cells moved very slowly, N-cadherin stimulated the outgrowth of leading processes and the motility of MGE cells. Additional differences distinguished MGE cells cultured on laminin or N-cadherin. First, reciprocal interactions between MGE cells differed. MGE cells migrating on N-cadherin only shortly interacted and never aggregated, even if their density was high. Adhesive interactions between MGE cells were thus minimal. On the laminin substrate in contrast, MGE cells exhibited long-lasting and tight reciprocal interactions that quickly led to the formation of chains or cell aggregates. On this latter substrate of migration, MGE cells not only interacted with the protein substrate, but moreover with neighboring cells. These tight and long-lasting cell-cell interactions likely involve N-cadherin receptors, among other receptors, suggesting that the response of MGE cells to the laminin substrate was perturbed by additional and uncontrolled cell-cell interactions. By adding laminin to the N-cadherin substrate, we increased the frequency and duration of cell-cell contacts, suggesting functional interactions between integrin and N-cadherin receptors in migrating MGE cells. Second, MGE cells migrating on N-cadherin and on laminin differed by their morphologies and trajectories. On the laminin substrate, MGE cells were mainly bipolar and showed straight trajectories, whereas MGE cells migrating on N-cadherin alternated between bipolar and multipolar morphologies and showed complex trajectories. These differences in morphology suggest major differences in the organization of the cytoskeleton on the two substrates and will require further investigations.

## Influence of N-Cadherin Biomimetic Substrate on Centrosome Docking and on Primary Cilium Assembly

We have shown that the centrosome of GABAergic neurons born in the MGE of the basal telencephalon is a microtubule-organizing center that can moreover assemble a primary cilium at the distal end of the MC (Baudoin et al., 2012). An important function of the primary cilium is to anchor the centrosome to the plasma membrane (Pedersen et al., 2008; Reiter et al., 2012). In GABAergic neurons migrating a long distance from the basal



(Continued)

**FIGURE 5 | Continued**

**(C1,C2)** Migration on dissociated cortical cells of a cell electroporated with the dominant negative construct N-cad(t). **(D–F)** Histograms show the mean value and standard deviation of the average nuclear centrosomal distance **(D)**, of the instantaneous migration speed of the nucleus **(E)**, and of the ratio between centrosomal and nuclear instantaneous migration speeds **(F)** in wild type MGE cells monitored on N-cad-Fc (white bars), on cortical cells (gray bars) and in cadherin invalidated MGE cells monitored on cortical cells (blue bars). The nuclear speed is maximal in wild type MGE cells migrating on the pure N-cadherin substrate, and minimal in cadherin invalidated MGE cells. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Centrosomal and nuclear movements are synchronized in MGE cells migrating on the pure N-cadherin substrate; cadherin invalidation in MGE cells migrating on cortical cells disrupts the coordination between nuclear and centrosomal movements observed in wild type MGE cells.

telencephalon to the cortex, the MC is able to dock to the plasma membrane. It can associate with a primary cilium protruding at the cell surface (Baudoin et al., 2012; Higginbotham et al., 2012). In the cell samples that we analyzed here, the primary cilium was less frequently observed on MGE cells cultured on N-cad-Fc than on MGE cells cultured on laminin or on cortical cells. However, the proportion of MGE cells with the MC docked to the plasma membrane did not decrease when MGE cells were migrating on a pure substrate of N-cadherin. Moreover, the MC was able to dock on the cell surface at any distance from the nucleus. We observed ciliary vesicles at the same frequency in MGE cells cultured on cortical axons or on N-cad-Fc. The large ciliary vesicle observed at the distal end of MCs likely contributes to the anchoring of the MC to the plasma membrane through a mechanism involving membrane fusion (Sorokin, 1962). Therefore, the ability of the MC to assemble a ciliary vesicle and to dock to the plasma membrane was not perturbed on the substrate of N-cadherin, suggesting that the N-cadherin mediated cell-cell interaction did not allow primary cilium elongation or stabilization. This response of the primary cilium to a cell adhesion protein distributed in the environment was specific to N-cadherin since MGE cells migrating on laminin exhibited a primary cilium at the same frequency as MGE migrating with a “*in vivo like*” substrate of cortical cells.

An attractive hypothesis is that MC docking could interfere with centrosome motility. Our results do not support this hypothesis. Indeed, the centrosome moved twice faster in MGE cells cultured on N-cad-Fc than in MGE cells cultured on cortical cells, although it docked to the plasma membrane at the same frequency in both culture conditions. Even if our results argue against a role of plasma membrane docking to reducing MC motility, we cannot totally exclude this possibility. The primary cilium itself could contribute to regulate MCs motility by interacting with the substrate of migration. In agreement with our present results, we previously showed that the genetic ablation of the primary cilium in Kif3a KO MGE cells was correlated to a slight increase in the motility of the centrosome (Baudoin et al., 2012).

Integrin receptors have been described on the primary cilium (McGlashan et al., 2006; Seeger-Nukpezah and Golemis, 2012). Adhesive interactions with the extracellular matrix could transiently stabilize the primary cilium and the basal body.

Accordingly, the apical abscission of the primary cilium helps centrioles to move away from the basal lamina in progenitors of the cortical neuroepithelium (Das and Storey, 2014).

The role(s) of the primary cilium in cell migration is far from understood (Albrecht-Buehler, 1977; Katsumoto et al., 1994; Schneider et al., 2010; Métin and Pedraza, 2014). In adherent cells like fibroblasts or smooth muscle cells, the cilium has been shown to control cell directionality. The primary cilium of cortical interneurons concentrates receptors to factors in the environment that likely influence the migration of cortical interneurons (Higginbotham et al., 2012). The simultaneous monitoring of centrosomal and primary cilium dynamics shall permit to examine whether the primary cilium interferes with centriole motility in addition to collecting extrinsic signals.

### In MGE Cells Migrating on N-Cadherin, the Centrosome is Maintained at One Pole of the Nucleus

The present study revealed an unexpected behavior of the centrosome in MGE cells migrating on N-cad-Fc. In control MGE cells migrating on cortical cells the centrosome showed a progressive forward migration in front of the nucleus (Métin et al., 2008). After each nuclear translocation, the centrosome starts moving toward the leading process where it can stabilize before the next nuclear translocation (Yanagida et al., 2012). On N-cad-Fc, centrosomal movements were most often restricted to a subcellular domain located at one pole of the nucleus. This domain, that contained the GA and endoplasmic reticulum (ER) vesicles, could be large and the centrosome only rarely escaped to enter a process emerging from the cell body. The centrosome remained there, even during the time period when the cell reversed its direction of migration and when the nucleus moved alternatively forward and backward. This behavior of the centrosome is opposite to the behavior observed in N-cadherin ablated or N-cadherin invalidated MGE cells, in which the centrosome exhibited fast and large amplitude movements in the whole nuclear compartment, moving from the front to the rear of the nucleus. N-cadherin KO MGE cells frequently reversed their direction of movement and showed alternating forward and backward nuclear movements, as control MGE cells cultured on N-cad-Fc (Luccardini et al., 2013). N-cadherin ablation or invalidation disrupted the coordination between nuclear and centrosomal movements in MGE cells. On the contrary, N-cadherin activation stabilized the centrosome in a sub-region of the nuclear compartment. This important role of N-cadherin to stabilize the positioning of the centrosome in migrating MGE cells recalls N-cadherin function to control cell polarity in neural cells (Dupin et al., 2009; Gärtner et al., 2012), and to control *in vivo*, the polarized organization of cortical progenitors in the proliferative neuroepithelium (Kadowaki et al., 2007). Accordingly, the expression level of N-cadherin has also been shown to control the polarity and migration speed of glial cells in a wound-healing test (Camand et al., 2012). In MGE cells migrating on N-cad-Fc, the nuclear and centrosomal movements were highly synchronized, which was

not the case in MGE cells migrating on cortical cells. The regulatory mechanisms involved in this control remain to be explored.

In conclusion, we show here that N-cadherin-mediated cell-cell interactions are efficient signals for stimulating MGE cell motility, including centrosome motility. The negative correlation between centrosomal movements and primary cilium formation observed in MGE cells migrating on N-cadherin, remembers results in MGE cells with a genetic ablation of the primary cilium (Baudoin et al., 2012). In addition, our results show that N-cadherin mediated cell-cell interactions and integrin mediated ECM-cell interactions have distinct influences on the ciliogenesis in migrating MGE cells.

## References

Albrecht-Buehler, G. (1977). Phagokinetic tracks of 3T3 cells: parallels between the orientation of track segments and of cellular structures which contain actin or tubulin. *Cell* 12, 333–339. doi: 10.1016/0092-8674(77)90109-x

Anderson, S. A., Eisenstat, D. D., Shi, L., and Rubenstein, J. L. (1997). Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278, 474–476. doi: 10.1126/science.278.5337.474

Baudoin, J.-P., Viou, L., Launay, P.-S., Luccardini, C., Espeso Gil, S., Kiyasova, V., et al. (2012). Articulat tangentially migrating neurons assemble a primary cilium that promotes their reorientation to the cortical plate. *Neuron* 76, 1108–1122. doi: 10.1016/j.neuron.2012.10.027

Bellion, A., Baudoin, J.-P., Alvarez, C., Bornens, M., and Métin, C. (2005). Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J. Neurosci.* 25, 5691–5699. doi: 10.1523/jneurosci.1030-05.2005

Butt, S. J. B., Fuccillo, M., Nery, S., Noctor, S., Kriegstein, A., Corbin, J. G., et al. (2005). The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron* 48, 591–604. doi: 10.1016/j.neuron.2005.09.034

Camand, E., Peglion, F., Osmani, N., Sanson, M., and Etienne-Manneville, S. (2012). N-cadherin expression level modulates integrin-mediated polarity and strongly impacts on the speed and directionality of glial cell migration. *J. Cell Sci.* 125, 844–857. doi: 10.1242/jcs.087668

Das, R. M., and Storey, K. G. (2014). Apical abscission alters cell polarity and dismantles the primary cilium during neurogenesis. *Science* 343, 200–204. doi: 10.1126/science.1247521

Dupin, I., Camand, E., and Etienne-Manneville, S. (2009). Classical cadherins control nucleus and centrosome position and cell polarity. *J. Cell Biol.* 185, 779–786. doi: 10.1083/jcb.200812034

Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2003). Cell polarity: par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 67–72. doi: 10.1016/s0955-0674(02)00005-4

Flames, N., Pla, R., Gelman, D. M., Rubenstein, J. L. R., Puellas, L., and Marín, O. (2007). Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes. *J. Neurosci.* 27, 9682–9695. doi: 10.1523/jneurosci.2750-07.2007

Fogarty, M., Grist, M., Gelman, D., Marín, O., Pachnis, V., and Kessaris, N. (2007). Spatial genetic patterning of the embryonic neuroepithelium generates GABAergic interneuron diversity in the adult cortex. *J. Neurosci.* 27, 10935–10946. doi: 10.1523/jneurosci.1629-07.2007

Franco, S. J., Martinez-Garay, L., Gil-Sanz, C., Harkins-Perry, S. R., and Müller, U. (2011). Reelin regulates cadherin function via *Dab1/Rap1* to control neuronal migration and lamination in the neocortex. *Neuron* 69, 482–497. doi: 10.1016/j.neuron.2011.01.003

Gärtner, A., Fornasiero, E. F., Munck, S., Vennekens, K. A. L., Seuntjens, E., Huttner, W. B., et al. (2012). N-cadherin specifies first asymmetry in developing neurons. *EMBO J.* 31, 1893–1903. doi: 10.1038/emboj.2012.41

## Acknowledgments

We thank René-Marc Mège for help with the biomimetic substrates, Melissa Martin for english corrections and all the members of the team for helpful discussions. This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Agence Nationale pour la Recherche (ANR Grant MRGENE), Fondation J. Lejeune and Fondation pour la Recherche sur le Cerveau. CL was supported by a grant from Neuropole Ile de France and by the Grant MRGENE from ANR. C. Métin's team is affiliated with the Paris School of Neuroscience and the Bio-Psy Laboratory of Excellence. We thank Institut du Fer à Moulin for Imaging Facility and Animal Facility.

Higginbotham, H., Eom, T.-Y., Mariani, L. E., Bachleda, A., Hirt, J., Gukassyan, V., et al. (2012). *Arl13b* in primary cilia regulates the migration and placement of interneurons in the developing cerebral cortex. *Dev. Cell* 23, 925–938. doi: 10.1016/j.devcel.2012.09.019

Higginbotham, H. R., and Gleeson, J. G. (2007). The centrosome in neuronal development. *Trends Neurosci.* 30, 276–283. doi: 10.1016/j.tins.2007.04.001

Jossin, Y., and Cooper, J. A. (2011). Reelin, Rap1 and N-cadherin orient the migration of multipolar neurons in the developing neocortex. *Nat. Neurosci.* 14, 697–703. doi: 10.1038/nn.2816

Kadowaki, M., Nakamura, S., Machon, O., Krauss, S., Radice, G. L., and Takeichi, M. (2007). N-cadherin mediates cortical organization in the mouse brain. *Dev. Biol.* 304, 22–33. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.12.014

Katsumoto, T., Higaki, K., Ohno, K., and Onodera, K. (1994). The orientation of primary cilia during the wound response in 3Y1 cells. *Biol. Cell* 81, 17–21. doi: 10.1016/0248-4900(94)90050-7

Kawauchi, T. (2012). Cell adhesion and its endocytic regulation in cell migration during neural development and cancer metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 4564–4590. doi: 10.3390/ijms13044564

Kawauchi, T., Sekine, K., Shikanai, M., Chihama, K., Tomita, K., Kubo, K.-I., et al. (2010). Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-cadherin trafficking. *Neuron* 67, 588–602. doi: 10.1016/j.neuron.2010.07.007

Lambert, M., Padilla, F., and Mège, R. M. (2000). Immobilized dimers of N-cadherin-Fc chimera mimic cadherin-mediated cell contact formation: contribution of both outside-in and inside-out signals. *J. Cell Sci.* 113, 2207–2219. doi: 10.1159/000014630

Lawson, C. D., and Burridge, K. (2014). The on-off relationship of rho and rac during integrin-mediated adhesion and cell migration. *Small GTPases* 5:e27958. doi: 10.4161/sgtp.27958

Luccardini, C., Hennekinne, L., Viou, L., Yanagida, M., Murakami, F., Kessaris, N., et al. (2013). N-Cadherin sustains motility and polarity of future cortical interneurons during tangential migration. *J. Neurosci.* 33, 18149–18160. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0593-13.2013

Marín, O., Valiente, M., Ge, X., and Tsai, L.-H. (2010). Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a001834. doi: 10.1101/cshperspect.a001834

McGlashan, S. R., Jensen, C. G., and Poole, C. A. (2006). Localization of extracellular matrix receptors on the chondrocyte primary cilium. *J. Histochem. Cytochem.* 54, 1005–1014. doi: 10.1369/jhc.5a6866.2006

Métin, C., and Pedraza, M. (2014). Cilia: traffic directors along the road of cortical development. *Neuroscientist* 20, 468–482. doi: 10.1177/1073858414543151

Métin, C., Vallee, R. B., Rakic, P., and Bhide, P. G. (2008). Modes and mishaps of neuronal migration in the mammalian brain. *J. Neurosci.* 28, 11746–11752. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3860-08.2008

Miyoshi, G., Hjerling-Leffler, J., Karayannis, T., Sousa, V. H., Butt, S. J. B., Battiste, J., et al. (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. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4515-09.2010
- Nery, S., Fishell, G., and Corbin, J. G. (2002). The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nat. Neurosci.* 5, 1279–1287. doi: 10.1038/nn971
- Pedersen, L. B., Veland, I. R., Schröder, J. M., and Christensen, S. T. (2008). Assembly of primary cilia. *Dev. Dyn.* 237, 1993–2006. doi: 10.1002/dvdy.21521
- Reiter, J. F., Blacque, O. E., and Leroux, M. R. (2012). The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. *EMBO Rep.* 13, 608–618. doi: 10.1038/embor.2012.73
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., et al. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704–1709. doi: 10.1126/science.1092053
- Schneider, L., Cammer, M., Lehman, J., Nielsen, S. K., Guerra, C. F., Veland, I. R., et al. (2010). Directional cell migration and chemotaxis in wound healing response to PDGF-AA are coordinated by the primary cilium in fibroblasts. *Cell. Physiol. Biochem.* 25, 279–292. doi: 10.1159/000276562
- Seeger-Nukpezah, T., and Golemis, E. A. (2012). The extracellular matrix and ciliary signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 652–661. doi: 10.1016/j.ceb.2012.06.002
- Solecki, D. J. (2012). Sticky situations: recent advances in control of cell adhesion during neuronal migration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 791–798. doi: 10.1016/j.conb.2012.04.010
- Solecki, D. J., Model, L., Gaetz, J., Kapoor, T. M., and Hatten, M. E. (2004). Par6 $\alpha$  signaling controls glial-guided neuronal migration. *Nat. Neurosci.* 7, 1195–1203. doi: 10.1038/nn1332
- Sorokin, S. (1962). Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 15, 363–373. doi: 10.1083/jcb.15.2.363
- Taniguchi, H., Kawauchi, D., Nishida, K., and Murakami, F. (2006). Classic cadherins regulate tangential migration of precerebellar neurons in the caudal hindbrain. *Development* 133, 1923–1931. doi: 10.1242/dev.02414
- Ueda, M., Gräf, R., MacWilliams, H. K., Schliwa, M., and Euteneuer, U. (1997). Centrosome positioning and directionality of cell movements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 9674–9678. doi: 10.1073/pnas.94.18.9674
- Valiente, M., and Marín, O. (2010). Neuronal migration mechanisms in development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20, 68–78. doi: 10.1016/j.conb.2009.12.003
- Wichterle, H., García-Verdugo, J. M., Herrera, D. G., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. *Nat. Neurosci.* 2, 461–466. doi: 10.1038/8131
- Wonders, C. P., and Anderson, S. A. (2006). The origin and specification of cortical interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 687–696. doi: 10.1038/nrn1954
- Yanagida, M., Miyoshi, R., Toyokuni, R., Zhu, Y., and Murakami, F. (2012). Dynamics of the leading process, nucleus and golgi apparatus of migrating cortical interneurons in living mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 109, 16737–16742. doi: 10.1073/pnas.1209166109

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Luccardini, Leclech, Viou, Rio and Métin. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution and reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



# Bibliographie



## Bibliographie

- Abrams, G., Goodman, S., Nealey, P., Franco, M., and Murphy, C. (2000). Nanoscale topography of the basement membrane underlying the corneal epithelium of the rhesus macaque. *Cell Tissue Res* 299, 39–46.
- Albrecht-Buehler, G. (1980). Autonomous movements of cytoplasmic fragments. *Cell Biol.* 77, 6639–6643.
- Anava, S., Greenbaum, A., Ben Jacob, E., Hanein, Y., and Ayali, A. (2009). The regulative role of neurite mechanical tension in network development. *Biophys. J.* 96, 1661–1670.
- Anderson, S.A., Eisenstat, D.D., Shi, L., and Rubenstein, J.L. (1997). Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278, 474–476.
- Anderson, S.A., Marín, O., Horn, C., Jennings, K., and Rubenstein, J.L. (2001). Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128, 353–363.
- Ang, E.S.B.C., Haydar, T.F., Gluncic, V., and Rakic, P. (2003). Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. *J. Neurosci.* 23, 5805–5815.
- Anton, E.S., Kreidberg, J.A., and Rakic, P. (1999). Distinct Functions of alpha3 and alpha5 Integrin Receptors in Neuronal Migration and Laminar Organization of the Cerebral Cortex A family. *Neuron Grumet* 22, 277–289.
- Antypa, M., Faux, C., Eichele, G., Parnavelas, J.G., and Andrews, W.D. (2011). Differential gene expression in migratory streams of cortical interneurons. *Eur. J. Neurosci.* 34, 1584–1594.
- Au, T.H., Cheng, I., Chowdhury, M.F., and Radisic, M. (2007). Interactive effects of surface topography and pulsatile electrical field stimulation on orientation and elongation of fibroblasts and cardiomyocytes. *Biomaterials* 28, 4277–4293.
- Avila, A., Vidal, P.M., Dear, T.N., Harvey, R.J., Rigo, J.-M., and Nguyen, L. (2013). Glycine receptor  $\alpha 2$  subunit activation promotes cortical interneuron migration. *Cell Rep.* 4, 738–750.
- Balgude, A.P., Yu, X., Szymanski, A., and Bellamkonda, R. V (2001). Agarose gel stiffness determines rate of DRG neurite extension in 3D cultures. *Biomaterials* 22, 1077–1084.
- Barnes, J.M., Przybyla, L., and Weaver, V.M. (2017). Tissue mechanics regulate brain development, homeostasis and disease. *J. Cell Sci.* 130, 71–82.
- Bartolini, G., Ciceri, G., and Marín, O. (2013). Integration of GABAergic Interneurons into Cortical Cell Assemblies: Lessons from Embryos and Adults. *Neuron* 79, 849–864.
- Bartolini, G., Sánchez-Alcañiz, J.A., Osório, C., Valiente, M., García-Frigola, C., and Marín, O. (2017). Neuregulin 3 Mediates Cortical Plate Invasion and Laminar Allocation of GABAergic Interneurons. *Cell Rep.* 18, 1157–1170.
- Baudoin, J.-P., Alvarez, C., Gaspar, P., and Métin, C. (2008). Nocodazole-induced changes in microtubule dynamics impair the morphology and directionality of migrating medial ganglionic eminence cells. *Dev. Neurosci.* 30, 132–143.
- Baudoin, J.-P., Viou, L., Launay, P.-S., Luccardini, C., Espeso Gil, S., Kiyasova, V., Irinopoulou, T., Alvarez, C., Rio, J.-P., Boudier, T., et al. (2012). Tangentially migrating neurons assemble a primary cilium that promotes their reorientation to the cortical plate. *Neuron* 76, 1108–1122.

- Beggs, H.E., Schahin-Reed, D., Zang, K., Goebbels, S., Nave, K.A., Gorski, J., Jones, K.R., Sretavan, D., and Reichardt, L.F. (2003). FAK deficiency in cells contributing to the basal lamina results in cortical abnormalities resembling congenital muscular dystrophies. *Neuron* *40*, 501–514.
- Behar, T.N., Dugich-Djordjevic, M.M., Li, Y.X., Ma, W., Somogyi, R., Wen, X., Brown, E., Scott, C., McKay, R.D., and Barker, J.L. (1997). Neurotrophins stimulate chemotaxis of embryonic cortical neurons. *Eur. J. Neurosci.* *9*, 2561–2570.
- Bellion, A., Baudoin, J.-P., Alvarez, C., Bornens, M., and Métin, C. (2005). Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J. Neurosci.* *25*, 5691–5699.
- Le Berre, M., Aubertin, J., and Piel, M. (2012). Fine control of nuclear confinement identifies a threshold deformation leading to lamina rupture and induction of specific genes. *Integr. Biol. (Camb).* *4*, 1406–1414.
- Biela, S.A., Su, Y., Spatz, J.P., and Kemkemer, R. (2009). Different sensitivity of human endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts to topography in the nano-micro range. *Acta Biomater.* *5*, 2460–2466.
- Biggs, M.J.P., Richards, R.G., Mcfarlane, S., Wilkinson, C.D.W., Oreffo, R.O.C., and Dalby, M.J. (2008). Adhesion formation of primary human osteoblasts and the functional response of mesenchymal stem cells to 330 nm deep microgrooves. *J. R. Soc. Interface* *5*, 1231–1242.
- Te Boekhorst, V., Preziosi, L., and Friedl, P. (2016). Plasticity of Cell Migration In Vivo and In Silico. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *32*, 491–526.
- Bonneau, D., Toutain, A., Laquerrière, A., Marret, S., Saugier-Veber, P., Barthez, M.-A., Radi, S., Biran-Mucignat, V., Rodriguez, D., and Gélot, A. (2002). X-Linked Lissencephaly with Absent Corpus Callosum and Ambiguous Genitalia (XLAG): Clinical, Magnetic Resonance Imaging, and Neuropathological Findings. *Ann Neurol* *51*, 340–349.
- Bortone, D., and Polleux, F. (2009). KCC2 Expression Promotes the Termination of Cortical Interneuron Migration in a Voltage-Sensitive Calcium-Dependent Manner. *Neuron* *62*, 53–71.
- Bovetti, S., Hsieh, Y.-C., Bovolín, P., Perroteau, I., Kazunori, T., and Puche, A.C. (2007). Blood Vessels Form a Scaffold for Neuroblast Migration in the Adult Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* *27*, 5976–5980.
- den Braber, E.T., de Ruijter, J.E., Ginsel, L.A., von Recum, A.F., and Jansen, J.A. (1998). Orientation of ECM protein deposition, fibroblast cytoskeleton, and attachment complex components on silicone microgrooved surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* *40*, 291–300.
- Brammer, K.S., Oh, S., Gallagher, J.O., and Jin, S. (2008). Enhanced cellular mobility guided by TiO<sub>2</sub> nanotube surfaces. *Nano Lett.* *8*, 786–793.
- Bravo-Cordero, J.J., Magalhaes, M.O.A., Eddy, R.J., Hodgson, L., and Condeelis, J. (2013). Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nat. Publ. Gr.* *14*.
- Breau, M.A., Bonnet, I., Stoufflet, J., Xie, J., De Castro, S., and Schneider-Maunoury, S. (2017). Extrinsic mechanical forces mediate retrograde axon extension in a developing neuronal circuit. *Nat. Commun.* *8*, 282.
- Britto, J.M., Johnston, L.A., and Tan, S.-S. (2009). The Stochastic Search Dynamics of Interneuron Migration. *Biophys. J.* *97*, 699–709.
- Brown, K.N., Chen, S., Han, Z., Lu, C.-H., Tan, X., Zhang, X.-J., Ding, L., Lopez-Cruz, A., Saur, D., Anderson, S.A., et al. (2011). Clonal production and organization of inhibitory interneurons in the neocortex. *Science* *334*, 480–486.

- Bugnicourt, G., Brocard, J., Nicolas, A., and Villard, C. (2014). Nanoscale surface topography reshapes neuronal growth in culture. *Langmuir* *30*, 4441–4449.
- Bugyi, B., and Carlier, M.-F. (2010). Control of Actin Filament Treadmilling in Cell Motility. *Annu. Rev. Biophys* *39*, 449–470.
- Butt, S.J.B., Fuccillo, M., Nery, S., Noctor, S., Kriegstein, A., Corbin, J.G., and Fishell, G. (2005). The Temporal and Spatial Origins of Cortical Interneurons Predict Their Physiological Subtype. *Neuron* *48*, 591–604.
- Caballero, D., Comelles, J., Piel, M., Voituriez, R., and Riveline, D. (2015). Ratchetaxis: Long-Range Directed Cell Migration by Local Cues. *Trends Cell Biol.* *25*, 815–827.
- De Carlos, J.A., López-Mascaraque, L., and Valverde, F. (1996). Dynamics of Cell Migration from the Lateral Ganglionic Eminence in the Rat. *J. Neurosci.* *16*, 6146–6156.
- Causeret, F., Hidalgo-Sanchez, M., Fort, P., Backer, S., Popoff, M.-R., Gauthier-Rouvière, C., and Bloch-Gallego, E. (2004). Distinct roles of Rac1/Cdc42 and Rho/Rock for axon outgrowth and nucleokinesis of precerebellar neurons toward netrin 1. *Development* *131*, 2841–2852.
- Cecchini, M. (2008). PC12 polarity on biopolymer nanogratings. *J. Phys. Conf. Ser.* *100*, 012003.
- Charest, J.L., Eliason, M.T., García, A.J., and King, W.P. (2006). Combined microscale mechanical topography and chemical patterns on polymer cell culture substrates. *Biomaterials* *27*, 2487–2494.
- Charest, J.L., García, A.J., and King, W.P. (2007). Myoblast alignment and differentiation on cell culture substrates with microscale topography and model chemistries. *Biomaterials* *28*, 2202–2210.
- Charras, G., and Sahai, E. (2014). Physical influences of the extracellular environment on cell migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 813–824.
- Chaurey, V., Block, F., Su, Y.-H., Chiang, P.-C., Botchwey, E., Chou, C.-F., and Swami, N.S. (2012). Nanofiber size-dependent sensitivity of fibroblast directionality to the methodology for scaffold alignment. *Acta Biomater.* *8*, 3982–3990.
- Chua, J.S., Chng, C.-P., Moe, A.A.K., Tann, J.Y., Goh, E.L.K., Chiam, K.-H., and Yim, E.K.F. (2014). Extending neurites sense the depth of the underlying topography during neuronal differentiation and contact guidance. *Biomaterials* *35*, 7750–7761.
- Ciceri, G., Dehorter, N., Sols, I., Huang, Z.J., Maravall, M., and Marín, O. (2013). Lineage-specific laminar organization of cortical GABAergic interneurons. *Nat. Neurosci.* *16*, 1199–1210.
- Clark, P., Connolly, P., Curtis, A.S.G., Dow, J.A.T., and Wilkinson, C.D.W. (1990). Topographical control of cell behaviour: II. multiple grooved substrata. *Development* *108*, 635–644.
- Comelles, J., Caballero, D., Voituriez, R., Hortigüela, V., Wollrab, V., Godeau, A.L., Samitier, J., Martínez, E., and Riveline, D. (2014). Cells as active particles in asymmetric potentials: motility under external gradients. *Biophys. J.* *107*, 1513–1522.
- Cooper, J.A. (2013). Mechanisms of cell migration in the nervous system. *J. Cell Biol.* *202*, 725–734.
- Cooper, J.A., Kawachi, T., and Förster, E. (2014). Molecules and mechanisms that regulate multipolar migration in the intermediate zone. *Front. Cell. Neurosci.* *8*:386.
- Crandall, J.E., McCarthy, D.M., Araki, K.Y., Sims, J.R., Ren, J.-Q., and Bhide, P.G. (2007). Dopamine Receptor Activation Modulates GABA Neuron Migration from the Basal Forebrain to the Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* *27*, 3813–3822.

- Crouch, A.S., Miller, D., Luebke, K.J., and Hu, W. (2008). Correlation of anisotropic cell behaviors with topographic aspect ratio. *Biomaterials* 30, 1560–1567.
- Cunningham, C.C., Gorlin, J.B., Kwiatkowski, D.J., Hartwig, J.H., Janmey, P.A., Byers, H.R., and Stossel, T.P. (1992). Actin-Binding Protein Requirement for Cortical Stability and Efficient Locomotion. *Science* (80-. ). 255, 325–327.
- Curtis, A., and Wilkinson, C. (1997). Topographical control of cells. *Biomaterials* 18, 1573–1583.
- Curtis, A.S.G., and Varde, M. (1964). Control of Cell Behavior: Topological Factors. *J. Natl. Cancer Inst.* 33, 15–26.
- Cuzon, V.C., Yeh, P.W., Cheng, Q., and Yeh, H.H. (2006). Ambient GABA Promotes Cortical Entry of Tangentially Migrating Cells Derived from the Medial Ganglionic Eminence. *16*, 1377–1388.
- Cuzon, V.C., Yeh, P.W.L., Yanagawa, Y., Obata, K., and Yeh, H.H. (2008). Ethanol Consumption during Early Pregnancy Alters the Disposition of Tangentially Migrating GABAergic Interneurons in the Fetal Cortex. *J. Neurosci.* 28, 1854–1864.
- Dalby, M.J., Hart, A., and Yarwood, S.J. (2008). The effect of the RACK1 signalling protein on the regulation of cell adhesion and cell contact guidance on nanometric grooves. *Biomaterials* 29, 282–289.
- Dalton, B.A., Walboomers, X.F., Dziegielewska, M., Evans, M.D., Taylor, S., Jansen, J.A., and Steele, J.G. (2001). Modulation of epithelial tissue and cell migration by microgrooves. *J. Biomed. Mater. Res.* 56, 195–207.
- Danowski, B.A. (1989). Fibroblast contractility and actin organization are stimulated by microtubule inhibitors. *J. Cell Sci.* 93.
- Darnell, D., and Gilbert, S.F. (2017). *Neuroembryology*. Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. 6, e215.
- Denaxa, M., Chan, C.H., Schachner, M., Parnavelas, J.G., and 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.
- Denaxa, M., Kyriakopoulou, K., Theodorakis, K., Trichas, G., Vidaki, M., Takeda, Y., Watanabe, K., and Karagogeos, D. (2005). The adhesion molecule TAG-1 is required for proper migration of the superficial migratory stream in the medulla but not of cortical interneurons. *Dev. Biol.* 288, 87–99.
- Devreotes, P., and Janetopoulos, C. (2003). Eukaryotic Chemotaxis: Distinctions between Directional Sensing and Polarization. *J. Biol. Chem.* 278, 20445–20448.
- Diehl, K.A., Foley, J.D., Nealey, P.F., and Murphy, C.J. (2005). Nanoscale topography modulates corneal epithelial cell migration. *J Biomed Mater Res* 75, 603–611.
- Disanza, A., Steffen, A., Hertzog, M., Frittoli, E., Rottner, K., and Scita, G. (2005). Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 955–970.
- Distel, M., Hocking, J.C., Volkmann, K., and Köster, R.W. (2010). The centrosome neither persistently leads migration nor determines the site of axonogenesis in migrating neurons in vivo. *J. Cell Biol.* 191, 875–890.
- Dogterom, M., and Yurke, B. (1997). Measurement of the force-velocity relation for growing microtubules. *Science* 278, 856–860.
- Dowell-Mesfin, N.M., Abdul-Karim, M.-A., Turner, A.M.P., Schanz, S., Craighead, H.G., Roysam, B., Turner, J.N., and Shain, W. (2004). Topographically modified surfaces affect orientation and growth of hippocampal neurons. *J. Neural Eng.* 1, 78–90.

- Doyle, A.D., Wang, F.W., Matsumoto, K., and Yamada, K.M. (2009). One-dimensional topography underlies three-dimensional fibrillar cell migration. *J. Cell Biol.* *184*, 481–490.
- Van Eden, C., Mrzuak, L., Voorn, P., Wlings, H., and Cgve, A. (1989). Prenatal Development of GABAergic Neurons in the Neocortex of the Rat. *J. Comp. Neurol.* 289213–289227.
- Elias, L.A.B., Turmaine, M., Parnavelas, J.G., and Kriegstein, A.R. (2010). Connexin 43 mediates the tangential to radial migratory switch in ventrally derived cortical interneurons. *J. Neurosci.* *30*, 7072–7077.
- Elosegui-Artola, A., Andreu, I., Beedle, A.E.M., Navajas, D., Garcia-Manyes, S., Lezamiz, A., Uroz, M., Kosmalska, A.J., Oria, R., Kechagia, J.Z., et al. (2017). Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. *Cell* *171*, 1397–1410.
- Etienne-Manneville, S. (2013). Microtubules in Cell Migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *29*, 471–499.
- Ezratty, E.J., Bertaux, C., Marcantonio, E.E., and Gundersen, G.G. (2009). Clathrin mediates integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells. *J. Cell Biol.* *187*, 733–747.
- Faux, C., Rakic, S., Andrews, W., and Britto, J.M. (2012). Neurons on the Move: Migration and Lamination of Cortical Interneurons. *Neurosignals* *20*, 164–185.
- Ferrari, A., Cecchini, M., Serresi, M., Faraci, P., Pisignano, D., and Beltram, F. (2010). Neuronal polarity selection by topography-induced focal adhesion control. *Biomaterials* *31*, 4682–4694.
- Fischer, R.S., Gardel, M., Ma, X., Adelstein, R.S., and Waterman, C.M. (2009). Local cortical tension by myosin II guides 3D endothelial cell branching. *Curr. Biol.* *19*, 260–265.
- Flames, N., Long, J.E., Garratt, A.N., Fischer, T.M., Gassmann, M., Birchmeier, C., Lai, C., Rubenstein, J.L.R., and Marín, O. (2004). Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* *44*, 251–261.
- Flanagan, L.A., Ju, Y.-E., Marg, B., Osterfield, M., and Janmey, P.A. (2002). Neurite branching on deformable substrates. *Neuroreport* *13*, 2411–2415.
- de Forges, H., Bouissou, A., and Perez, F. (2012). Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *44*, 266–274.
- Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M.C., Friocourt, G., McDonnell, N., Reiner, O., Kahn, A., et al. (1999). Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* *23*, 247–256.
- Franco, S.J., and Huttenlocher, A. (2005). Regulating cell migration: calpains make the cut. *J. Cell Sci.* *118*, 3829–3838.
- Frey, M.T., Tsai, I.Y., Russell, T.P., Hanks, S.K., and Wang, Y.L. (2006). Cellular responses to substrate topography: Role of myosin II and focal adhesion kinase. *Biophys. J.* *90*, 3774–3782.
- Friedl, P. (2004). Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* *16*, 14–23.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 362–374.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell Biol.* *188*, 11–19.
- Friocourt, G., Koulakoff, A., Chafey, P., Boucher, D., Fauchereau, F., Chelly, J., and Francis, F. (2003). Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. *Cereb. Cortex* *13*, 620–626.

- Frisch, S.M., and Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* *124*, 619–626.
- Fuccillo, M., Joyner, A.L., and Fishell, G. (2006). Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 772–783.
- Gangatharan, G., Schneider-Maunoury, S., and Breau, M.A. (2018). Role of mechanical cues in shaping neuronal morphology and connectivity. *Biol. Cell* *110*, 125–136.
- Gasiorowski, J.Z., Liliensiek, S.J., Russell, P., Stephan, D.A., Nealey, P.F., and Murphy, C.J. (2010). Alterations in gene expression of human vascular endothelial cells associated with nanotopographic cues. *Biomaterials* *31*, 8882–8888.
- Gelman, D.M., and Marín, O. (2010). Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex. *Eur. J. Neurosci.* *31*, 2136–2141.
- Gelman, D., Griveau, A., Dehorter, N., Teissier, A., Varela, C., Pla, R., Pierani, A., and Marín, O. (2011). A Wide Diversity of Cortical GABAergic Interneurons Derives from the Embryonic Preoptic Area. *J. Neurosci.* *31*, 16570–16580.
- Gelman, D.M., Martini, F.J., Nóbrega-Pereira, S., Pierani, A., Kessar, N., and Marín, O. (2009). The Embryonic Preoptic Area Is a Novel Source of Cortical GABAergic Interneurons.
- Gerecht, S., Bettinger, C.J., Zhang, Z., Borenstein, J.T., Vunjak-Novakovic, G., and Langer, R. (2007). The effect of actin disrupting agents on contact guidance of human embryonic stem cells. *Biomaterials* *28*, 4068–4077.
- Ghassemi, S., Meacci, G., Liu, S., Gondarenko, A.A., Mathur, A., Roca-Cusachs, P., Sheetz, M.P., Hone, J., and Yamada, K.M. (2012). Cells test substrate rigidity by local contractions on submicrometer pillars. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 5328–5333.
- Ghibaud, M., Trichet, L., Le Digabel, J., Richert, A., Hersen, P., and Ladoux, B. (2009). Substrate topography induces a crossover from 2D to 3D behavior in fibroblast migration. *Biophys. J.* *97*, 357–368.
- Gierke, S., and Wittmann, T. (2012). EB1-recruited microtubule +TIP complexes coordinate protrusion dynamics during 3D epithelial remodeling. *Curr. Biol.* *22*, 753–762.
- Godin, J.D., Mie Thomas, N., Laguesse, S., Malinouskaya, L., Close, P., Malaise, O., Purnelle, A., Raineteau, O., Campbell, K., Fero, M., et al. (2012). p27Kip 1 Is a Microtubule-Associated Protein that Promotes Microtubule Polymerization during Neuron Migration. *Dev. Cell* *23*, 729–744.
- Gomez, N., Lu, Y., Chen, S., and Schmidt, C.E. (2007a). Immobilized nerve growth factor and microtopography have distinct effects on polarization versus axon elongation in hippocampal cells in culture. *Biomaterials* *28*, 271–284.
- Gomez, N., Chen, S., and Schmidt, C.E. (2007b). Polarization of hippocampal neurons with competitive surface stimuli: contact guidance cues are preferred over chemical ligands. *J. R. Soc. Interface* *4*, 223–233.
- Gopal, P.P., Simonet, J.C., Shapiro, W., and Golden, J.A. (2010). Leading Process Branch Instability in Lis1 1/2 Nonradially Migrating Interneurons. *Cereb. Cortex* *20*, 1497–1505.
- Goreham, R. V., Mierczynska, A., Smith, L.E., Sedev, R., and Vasilev, K. (2013). Small surface nanotopography encourages fibroblast and osteoblast cell adhesion. *RSC Adv.* *3*, 10309.
- Graus-Porta, D., Blaess, S., Senften, M., Littlewood-Evans, A., Damsky, C., Huang, Z., Orban, P., Klein, R., Schittny, J.C., and Müller, U. (2001). Beta1-class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. *Neuron* *31*, 367–379.

- Guo, W.-H., Frey, M.T., Burnham, N.A., and Wang, Y.-L. (2006). Substrate Rigidity Regulates the Formation and Maintenance of Tissues. *Biophys. J.* *90*, 2213–2220.
- Halfter, W., Dong, S., Yip, Y.-P., Willem, M., and Mayer, U. (2002). A critical function of the pial basement membrane in cortical histogenesis. *J. Neurosci.* *22*, 6029–6040.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science* (80-. ). *279*, 509–514.
- Hamilton, D.W., Oakley, C., Jaeger, N.A.F., and Brunette, D.M. (2009). Directional change produced by perpendicularly-oriented microgrooves is microtubule-dependent for fibroblasts and epithelium. *Cell Motil. Cytoskeleton* *66*, 260–271.
- Han, G., Liu, B., Zhang, J., Zuo, W., Morris, N.R., and Xiang, X. (2001). The *Aspergillus* cytoplasmic dynein heavy chain and NUDF localize to microtubule ends and affect microtubule dynamics. *Curr. Biol.* *11*, 719–724.
- Hanson, J.N., Motala, M.J., Heien, M.L., Gillette, M., Sweedler, J., and Nuzzo, R.G. (2009). Textural guidance cues for controlling process outgrowth of mammalian neurons. *Lab Chip* *9*, 122–131.
- Harrison, R.G. (1914). The reaction of embryonic cells to solid structures. *J. Exp. Zool.* *17*, 521–544.
- Harwell, C.C., Fuentealba, L.C., Gonzalez-Cerrillo, A., Parker, P.R.L., Gertz, C.C., Mazzola, E., Garcia, M.T., Alvarez-Buylla, A., Cepko, C.L., and Kriegstein, A.R. (2015). Wide Dispersion and Diversity of Clonally Related Inhibitory Interneurons. *Neuron* *87*, 999–1007.
- He, M., Zhang, Z., Guan, C., Xia, D., and Yuan, X. (2010). Leading tip drives soma translocation via forward F-actin flow during neuronal migration. *J. Neurosci.* *30*, 10885–10898.
- Hendry, S.H., Schwark, H.D., Jones, E.G., and Yan, J. (1987). Numbers and proportions of GABA-immunoreactive neurons in different areas of monkey cerebral cortex. *J. Neurosci.* *7*, 1503–1519.
- Herculano-Houzel, S. (2009). The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front. Hum. Neurosci.* *3*, 31.
- Heredia, A., Bui, C.C., Suter, U., Young, P., and Schäffer, T.E. (2007). AFM combines functional and morphological analysis of peripheral myelinated and demyelinated nerve fibers. *Neuroimage* *37*, 1218–1226.
- Hevner, R.F., Daza, R.A.M., Englund, C., Kohtz, J., and Fink, A. (2004). Postnatal shifts of interneuron position in the neocortex of normal and *reeler* mice: evidence for inward radial migration. *Neuroscience* *124*, 605–618.
- Higginbotham, H., Eom, T.-Y., Mariani, L.E., Bachleda, A., Hirt, J., Gukassyan, V., Cusack, C.L., Lai, C., Caspary, T., and Anton, E.S. (2012). *Arl13b* in primary cilia regulates the migration and placement of interneurons in the developing cerebral cortex. *Dev. Cell* *23*, 925–938.
- Hoffman-Kim, D., Mitchel, J.A., and Bellamkonda, R. V (2010). Topography, cell response, and nerve regeneration. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* *12*, 203–231.
- Horesh, D., Sapir, T., Francis, F., Wolf, S.G., Caspi, M., Elbaum, M., Chelly, J., and Reiner, O. (1999). Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum. Mol. Genet.* *8*, 1599–1610.
- Hung, W.-C., Chen, S.-H., Paul, C.D., Stroka, K.M., Lo, Y.-C., Yang, J.T., and Konstantopoulos, K. (2013). Distinct signaling mechanisms regulate migration in unconfined versus confined spaces. *J. Cell Biol.* *202*, 807–824.
- Inada, H., Watanabe, M., Uchida, T., Ishibashi, H., 1x, H.W., Nemoto, T., Yanagawa, Y., Fukuda, A., Nabekura, J., and Manzoni, O.J. (2011). GABA Regulates the Multidirectional Tangential Migration of GABAergic Interneurons in Living Neonatal Mice. *PLoS One* *6*, e27048.

- Inamura, N., Kimura, T., Tada, S., Kurahashi, T., Yanagida, M., Yanagawa, Y., Ikenaka, K., and Murakami, F. (2012). Intrinsic and Extrinsic Mechanisms Control the Termination of Cortical Interneuron Migration. *J. Neurosci.* *32*, 6032–6042.
- Inan, M., Welagen, J., and Anderson, S.A. (2012). Spatial and Temporal Bias in the Mitotic Origins of Somatostatin-and Parvalbumin-Expressing Interneuron Subgroups and the Chandelier Subtype in the Medial Ganglionic Eminence. *Cereb. Cortex* April 22, 820–827.
- Inan, M., Petros, T.J., and Anderson, S.A. (2013). Losing your inhibition: Linking cortical GABAergic interneurons to schizophrenia. *Neurobiol. Dis.* *53*, 36–48.
- Irimia, D., and Toner, M. (2009). Spontaneous migration of cancer cells under conditions of mechanical confinement. *Integr. Biol.* *1*, 506–512.
- Iwashita, M., Kataoka, N., Toida, K., and Kosodo, Y. (2014). Systematic profiling of spatiotemporal tissue and cellular stiffness in the developing brain. *Development* *141*, 3793–3798.
- James, J., Goluch, E.D., Hu, H., Liu, C., and Mrksich, M. (2008). Subcellular Curvature at the Perimeter of Micropatterned Cells Influences Lamellipodial Distribution and Cell Polarity. *Cell Motil. Cytoskeleton* *65*, 841–852.
- Janke, C., and Bulinski, C. (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 773–786.
- Jeon, H., Koo, S., Reese, W.M., Loskill, P., Grigoropoulos, C.P., and Healy, K.E. (2015). Directing cell migration and organization via nanocrater-patterned cell-repellent interfaces. *Nat. Mater.* *14*, 918–923.
- Jiang, X., Bruzewicz, D.A., Wong, A.P., Piel, M., and Whitesides, G.M. (2004). Directing cell migration with asymmetric micropatterns. *PNAS* *102*, 975–978.
- Kanatani, S., Yozu, M., Tabata, H., and Nakajima, K. (2008). COUP-TFII Is Preferentially Expressed in the Caudal Ganglionic Eminence and Is Involved in the Caudal Migratory Stream. *J. Neurosci.* *28*, 13582–13591.
- Kapitein, L.C., and Hoogenraad, C.C. (2015). Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton. *Neuron* *87*, 492–506.
- Kappeler, C., Saillour, Y., Baudoin, J.-P., Oise, F., Tuy, P.D., Alvarez, C., Houbron, C., Gaspar, P., Hamard, G., Chelly, J., et al. (2006). Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from doublecortin knockout mice. *Development* *133*, 1387–1400.
- Kaverina, I., Rottner, K., and Small, J.V. (1998). Targeting, Capture, and Stabilization of Microtubules at Early Focal Adhesions. *J. Cell Biol.* *142*, 181–190.
- Kepecs, A., and Fishell, G. (2014). Interneuron cell types are fit to function. *Nature* *505*, 318–326.
- Keren, K., Pincus, Z., Allen, G.M., Barnhart, E.L., Marriott, G., Mogilner, A., and Theriot, J.A. (2008). Mechanism of shape determination in motile cells. *Nature* *453*, 475–480.
- Khan, S.P., Auner, G.G., and Newaz, G.M. (2005). Influence of nanoscale surface roughness on neural cell attachment on silicon. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* *1*, 125–129.
- Khawaja, C.B., Peyton, S.R., and Putnam, A.J. (2006). Intrinsic mechanical properties of the extracellular matrix affect the behavior of pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* *290*, 1640–1650.
- Kim, D.-H., Seo, C.-H., Han, K., Kwon, K.W., Levchenko, A., and Suh, K.-Y. (2009a). Guided Cell Migration on Microtextured Substrates with Variable Local Density and Anisotropy. *Adv. Funct. Mater.* *19*, 1579–1586.

- Kim, D.-H., Lipke, E.A., Kim, P., Cheong, R., Thompson, S., Delannoy, M., Suh, K.-Y., Tung, L., and Levchenko, A. (2010). Nanoscale cues regulate the structure and function of macroscopic cardiac tissue constructs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 565–570.
- Kim, D.H., Han, K., Gupta, K., Kwon, K.W., Suh, K.Y., and Levchenko, A. (2009b). Mechanosensitivity of fibroblast cell shape and movement to anisotropic substratum topography gradients. *Biomaterials* *30*, 5433–5444.
- Kim, J., Kim, H.N., Lim, K.-T., Kim, Y., Seonwoo, H., Park, S.H., Lim, H.J., Kim, D.-H., Suh, K.-Y., Choung, P.-H., et al. (2013). Designing nanotopographical density of extracellular matrix for controlled morphology and function of human mesenchymal stem cells. *Sci. Rep.* *3*, 3552.
- Kitamura, K., Yanazawa, M., Sugiyama, N., Miura, H., Iizuka-Kogo, A., Kusaka, M., Omichi, K., Suzuki, R., Kato-Fukui, Y., Kamiirisa, K., et al. (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.
- Kon, E., Cossard, A., and Jossin, Y. (2017). Neuronal Polarity in the Embryonic Mammalian Cerebral Cortex. *Front. Cell. Neurosci.* *11*, 163.
- Koser, D.E., Thompson, A.J., Foster, S.K., Dwivedy, A., Pillai, E.K., Sheridan, G.K., Svoboda, H., Viana, M., Costa, L. da F., Guck, J., et al. (2016). Mechanosensing is critical for axon growth in the developing brain. *Nat. Neurosci.* *19*, 1592–1598.
- Kriegstein, A.R., and Noctor, S.C. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.* *27*, 392–399.
- Krubitzer, L., Kaas, J., Julius, D., and King, A. (2005). The evolution of the neocortex in mammals: how is phenotypic diversity generated? *Curr. Opin. Neurobiol.* *15*, 444–453.
- Kumada, T., Jiang, Y., Kawanami, A., Cameron, D.B., and Komuro, H. (2008). Autonomous turning of cerebellar granule cells in vitro by intrinsic programs. *Dev. Biol.* *326*, 237–249.
- Kundu, A., Micholt, L., Friedrich, S., Rand, D.R., Bartic, C., Braeken, D., and Levchenko, A. (2013). Superimposed topographic and chemical cues synergistically guide neurite outgrowth. *Lab Chip* *13*, 3070–3081.
- Kurosaka, S., and Kashina, A. (2008). Cell biology of embryonic migration. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* *84*, 102–122.
- Kwon, K.W., Doh, J., Choi, J.-C., Ahn, H., Park, J., Kwon, K.W., Park, H., and Song, K.H. (2012). Cells Nanotopography-Guided Migration of T Cells. *J. Immunol.* *189*, 2266–2273.
- Laclef, C., and Métin, C. (2018). Conserved rules in embryonic development of cortical interneurons. *Semin. Cell Dev. Biol.* *76*, 86–100.
- Ladoux, B., and Nicolas, A. (2012). Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. *Rep. Prog. Phys.* *75*, 116601.
- Lämmermann, T., and Sixt, M. (2009). Mechanical modes of “amoeboid” cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 636–644.
- Lämmermann, T., Bader, B.L., Monkley, S.J., Worbs, T., Wedlich-Söldner, R., Hirsch, K., Keller, M., Förster, R., Critchley, D.R., Fässler, R., et al. (2008). Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* *453*, 51–55.

- Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* *84*, 359–369.
- Lauffenburger, D.A., and Linderman, J.J. (1993). *Receptors : models for binding, trafficking, and signaling* (Oxford University Press).
- Lautenschläger, F., and Piel, M. (2013). Microfabricated devices for cell biology: all for one and one for all. *Curr. Opin. Cell Biol.* *25*, 116–124.
- Lavdas, A.A., Grigoriou, M., Pachnis, V., and Parnavelas, J.G. (1999). The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* *19*, 7881–7888.
- Leach, J.B., Brown, X.Q., Jacot, J.G., Dimilla, P.A., and Wong, J.Y. (2007). Neurite outgrowth and branching of PC12 cells on very soft substrates sharply decreases below a threshold of substrate rigidity. *J. Neural Eng* *4*, 26–34.
- Leclech, C., and Métin, C. (2018). In Vitro Models to Analyze the Migration of MGE-Derived Interneurons. *Methods Mol. Biol.* *1749*.
- Lenhart, S., Meier, M.-B., Meyer, U., Chi, L., and Wiesmann, H.P. (2005). Osteoblast alignment, elongation and migration on grooved polystyrene surfaces patterned by Langmuir–Blodgett lithography. *Biomaterials* *26*, 563–570.
- Letort, G., Ennomani, H., Gressin, L., Théry, M., and Blanchoin, L. (2015). Dynamic reorganization of the actin cytoskeleton. *F1000 Fac. Rev.* *4*.
- Li, N., and Folch, A. (2005). Integration of topographical and biochemical cues by axons during growth on microfabricated 3-D substrates. *Exp. Cell Res.* *311*, 307–316.
- Li, G., Adesnik, H., Li, J., Long, J., Nicoll, R.A., Rubenstein, J.L.R., and Pleasure, S.J. (2008a). Regional distribution of cortical interneurons and development of inhibitory tone are regulated by Cxcl12/Cxcr4 signaling. *J. Neurosci.* *28*, 1085–1098.
- Li, L., Nørrelykke, S.F., and Cox, E.C. (2008b). Persistent cell motion in the absence of external signals: a search strategy for eukaryotic cells. *PLoS One* *3*, e2093.
- Liliensiek, S.J., Wood, J.A., Yong, J., Auerbach, R., Nealey, P.F., and Murphy, C.J. (2010). Modulation of human vascular endothelial cell behaviors by nanotopographic cues. *Biomaterials* *31*, 5418–5426.
- Liu, Y.-J., Le Berre, M., Lautenschlaeger, F., Maiuri, P., Callan-Jones, A., Heuzé, M., Takaki, T., Voituriez, R., and Piel, M. (2015). Confinement and Low Adhesion Induce Fast Amoeboid Migration of Slow Mesenchymal Cells. *Cell* *160*, 659–672.
- Liu, Y., Ji, Y., Ghosh, K., Clark, R.A.F., Huang, L., and Rafailovich, M.H. (2009). Effects of fiber orientation and diameter on the behavior of human dermal fibroblasts on electrospun PMMA scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A* *90*, 1092–1106.
- Lo, C.M., Wang, H.B., Dembo, M., and Wang, Y.L. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys. J.* *79*, 144–152.
- Lodato, S., Rouaux, C., Quast, K.B., Jantrachotechatchawan, C., Studer, M., Hensch, T.K., and Arlotta, P. (2011). Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. *Neuron* *69*, 763–779.
- Long, J.E., Cobos, I., Potter, G.B., and Rubenstein, J.L.R. (2009). Dlx1/2 and Mash1 Transcription Factors Control MGE and CGE Patterning and Differentiation through Parallel and Overlapping Pathways. *Cereb. Cortex* July *19*, 96–106.

- López-Bendito, G., Luján, R., Shigemoto, R., Ganter, P., Paulsen, O., and Molnár, Z. (2003). Blockade of GABA(B) receptors alters the tangential migration of cortical neurons. *Cereb. Cortex* *13*, 932–942.
- López-Bendito, G., Sánchez-Alcañiz, J.A., Pla, R., Borrell, V., Picó, E., Valdeolmillos, M., and Marín, O. (2008). Chemokine signaling controls intracortical migration and final distribution of GABAergic interneurons. *J. Neurosci.* *28*, 1613–1624.
- Luccardini, C., Hennekinne, L., Viou, L., Yanagida, M., Murakami, F., Kessaris, N., Ma, X., Adelstein, R.S., Mège, R.-M., and Métin, C. (2013). N-cadherin sustains motility and polarity of future cortical interneurons during tangential migration. *J. Neurosci.* *33*, 18149–18160.
- Lysko, D.E., Putt, M., and Golden, J.A. (2011). SDF1 regulates leading process branching and speed of migrating interneurons. *J. Neurosci.* *31*, 1739–1745.
- Lysko, D.E., Putt, M., and Golden, J.A. (2014). SDF1 reduces interneuron leading process branching through dual regulation of actin and microtubules. *J. Neurosci.* *34*, 4941–4962.
- Le Magueresse, C., Alfonso, J., Bark, C., Eliava, M., Khrulev, S., and Monyer, H. (2012). Subventricular Zone-Derived Neuroblasts Use Vasculature as a Scaffold to Migrate Radially to the Cortex in Neonatal Mice. *Cereb. Cortex* *22*, 2285–2296.
- Mahmud, G., Campbell, C.J., Bishop, K.J.M., Komarova, Y.A., Chaga, O., Soh, S., Huda, S., Kandere-Grzybowska, K., and Grzybowski, B.A. (2009). Directing cell motions on micropatterned ratchets. *Nat. Phys.* *5*, 606–612.
- Mahoney, M.J., Chen, R.R., Tan, J., and Saltzman, W.M. (2005). The influence of microchannels on neurite growth and architecture. *Biomaterials* *26*, 771–778.
- Mai, J., Sun, C., Li, S., and Zhang, X. (2007). A microfabricated platform probing cytoskeleton dynamics using multidirectional topographical cues. *Biomed. Microdevices* *9*, 523–531.
- Maiuri, P., Rupprecht, J.-F., Wieser, S., Ruprecht, V., Bénichou, O., Carpi, N., Coppey, M., De Beco, S., Gov, N., Heisenberg, C.-P., et al. (2015). Actin Flows Mediate a Universal Coupling between Cell Speed and Cell Persistence. *Cell* *161*, 374–386.
- Manent, J.-B., Jorquera, I., Ben-Ari, Y., Aniksztejn, L., and Represa, A. (2006). Glutamate Acting on AMPA But Not NMDA Receptors Modulates the Migration of Hippocampal Interneurons. *J. Neurosci.* *26*, 5901–5909.
- Maniotis, A.J., Chen, C.S., and Ingber, D.E. (1997). Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 849–854.
- De Marco Garcia, N. V., García, M., Karayannis, T., and Fishell, G. (2011). Neuronal activity is required for the development of specific cortical interneuron subtypes. *Nature* *472*, 351–355.
- Marcorelles, P., Laquerrière, A., Adde-Michel, C., Marret, S., Saugier-Veber, P., Beldjord, C., and Friocourt, G. (2010). Evidence for tangential migration disturbances in human lissencephaly resulting from a defect in LIS1, DCX and ARX genes. *Acta Neuropathol.* *120*, 503–515.
- Marín, O. (2012). Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* *13*, 107–120.
- Marín, O., and Rubenstein, J.L. (2001). A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat. Rev. Neurosci.* *2*, 780–790.
- Marín, O., and Rubenstein, J.L.R. (2003). Cell migration in the forebrain. *Annu. Rev. Neurosci.* *26*, 441–483.

- Marín, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., and Rubenstein, J.L. (2001). Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 293, 872–875.
- Marín, O., Plump, A.S., Flames, N., Sánchez-Camacho, C., Tessier-Lavigne, M., and Rubenstein, J.L.R. (2003). Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on subcortical Slit1/2-independent repulsion and cortical attraction. *Development* 130, 1889–1901.
- Martini, F.J., and Valdeolmillos, M. (2010). Actomyosin contraction at the cell rear drives nuclear translocation in migrating cortical interneurons. *J. Neurosci.* 30, 8660–8670.
- Martini, F.J., Valiente, M., López Bendito, G., Szabó, G., Moya, F., Valdeolmillos, M., and Marín, O. (2009). Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. *Development* 136, 41–50.
- Matsuzaka, K., Walboomers, F., de Ruijter, A., and Jansen, J.A. (2000). Effect of microgrooved poly-l-lactic (PLA) surfaces on proliferation, cytoskeletal organization, and mineralized matrix formation of rat bone marrow cells. *Clin. Oral Implants Res.* 11, 325–333.
- Mayer, C., Jaglin, X.H., Cobbs, L.V., Bandler, R.C., Streicher, C., Cepko, C.L., Hippenmeyer, S., and Fishell, G. (2015). Clonally Related Forebrain Interneurons Disperse Broadly across Both Functional Areas and Structural Boundaries. *Neuron* 87, 989–998.
- Mccarthy, D.M., Zhang, X., Darnell, S.B., Sangrey, G.R., Yanagawa, Y., Sadri-Vakili, G., and Bhide, P.G. (2011). Cocaine Alters BDNF Expression and Neuronal Migration in the Embryonic Mouse Forebrain. *J. Neurosci.* 31, 13400–13411.
- Mcmanus, M.F., Nasrallah, I.M., Pancoast, M.M., Wynshaw-Boris, A., and Golden, J.A. (2004). Lis1 Is Necessary for Normal Non-Radial Migration of Inhibitory Interneurons. *Am. J. Pathol.* 165, 775–784.
- McManus, M.F., Nasrallah, I.M., Gopal, P.P., Baek, W.S., and Golden, J.A. (2004). Axon Mediated Interneuron Migration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 932–941.
- Meechan, D.W., Tucker, E.S., Maynard, T.M., and LaMantia, A.-S. (2012). Cxcr4 regulation of interneuron migration is disrupted in 22q11.2 deletion syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 18601–18606.
- Mello, A., Volkov, Y., Kelleher, D., and Prendergast, P.J. (2003). Comparative Locomotory Behavior of T Lymphocytes versus T Lymphoma Cells on Flat and Grooved Surfaces. *Ann. Biomed. Eng.* 31, 1106–1113.
- Mellor, H. (2010). The role of formins in filopodia formation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1803, 191–200.
- Métin, C., and Godement, P. (1996). The Ganglionic Eminence May Be an Intermediate Target for Corticofugal and Thalamocortical Axons. *J. Neurosci.* 3219–3235.
- Métin, C., Denizot, J.P., and Ropert, N. (2000). Intermediate zone cells express calcium-permeable AMPA receptors and establish close contact with growing axons. *J. Neurosci.* 20, 696–708.
- Métin, C., Baudoin, J.-P., Rakić, S., and Parnavelas, J.G. (2006). Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. *Eur. J. Neurosci.* 23, 894–900.
- Mili, S., and Macara, I.G. (2009). RNA localization and polarity: from A(PC) to Z(BP). *Trends Cell Biol.* 19, 156–164.
- Miller, C., Jeftinija, S., Mallapragada, S.K., and Mallapragada, S. (2002). Synergistic effects of physical and chemical guidance cues on neurite alignment and outgrowth on biodegradable polymer substrates. *TISSUE Eng.* 8, 367–378.

- Miller, P.M., Folkmann, A.W., Maia, A.R.R., Efimova, N., Efimov, A., and Kaverina, I. (2009). Golgi-derived CLASP-dependent microtubules control Golgi organization and polarized trafficking in motile cells. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1069–1080.
- Mingle, L.A., Okuhama, N.N., Shi, J., Singer, R.H., Condeelis, J., and Liu, G. (2005). Localization of all seven messenger RNAs for the actin-polymerization nucleator Arp2/3 complex in the protrusions of fibroblasts. *J. Cell Sci.* *118*, 2425–2433.
- Mione, M.C., Danevic, C., Boardman, P., Harris, B., and Parnavelas, J.G. (1994). Lineage analysis reveals neurotransmitter (GABA or glutamate) but not calcium-binding protein homogeneity in clonally related cortical neurons. *J. Neurosci.* *14*, 107–123.
- Mione, M.C., Cavanagh, J.F.R., Harris, B., and Parnavelas, J.G. (1997). Cell Fate Specification and Symmetrical/Asymmetrical Divisions in the Developing Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* *17*, 2018–2029.
- Miyoshi, G., and Fishell, G. (2011). GABAergic interneuron lineages selectively sort into specific cortical layers during early postnatal development. *Cereb. Cortex* *21*, 845–852.
- Miyoshi, G., Hjerling-Leffler, J., Karayannis, T., Sousa, V.H., Butt, S.J.B., Battiste, J., Johnson, J.E., Machold, R.P., and 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.
- Moffa, M., Sciancalepore, A.G., Passione, L.G., and Pisignano, D. (2014). Combined Nano- and Micro-Scale Topographic Cues for Engineered Vascular Constructs by Electrospinning and Imprinted Micro-Patterns. *Small* *10*, 2439–2450.
- Mogilner, A., and Keren, K. (2009). The Shape of Motile Cells. *Curr. Biol.* *19*, R762–R771.
- Nadarajah, B., Brunstrom, J.E., Grutzendler, J., Wong, R.O.L., and Pearlman, A.L. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat. Neurosci.* *4*, 143–150.
- Nadarajah, B., Alifragis, P., Wong, R.O.L., and Parnavelas, J.G. (2002). Ventricle-directed migration in the developing cerebral cortex. *Nat. Neurosci.* *5*, 218–224.
- Nagata, I., Kawana, A., and Nakatsuji, N. (1993). Perpendicular contact guidance of CNS neuroblasts on artificial microstructures. *Development* *117*, 401–408.
- Narboux-Nême, N., and Gaspar, P. (2008). Développement du cortex cérébral : apports récents des études chez la souris et les primates. *Epilepsies* *20*, 220–228.
- Nasrallah, I.M., McManus, M.F., Pancoast, M.M., Wynshaw-Boris, A., and Golden, J.A. (2006). Analysis of non-radial interneuron migration dynamics and its disruption in *Lis1*<sup>+/-</sup> mice. *J. Comp. Neurol.* *496*, 847–858.
- Nery, S., Fishell, G., and Corbin, J.G. (2002). The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nat. Neurosci.* *5*, 1279–1287.
- Nguyen, A.T., Sathe, S.R., and Yim, E.K.F. (2016). From nano to micro: topographical scale and its impact on cell adhesion, morphology and contact guidance. *J. Phys. Condens. Matter* *28*, 183001.
- Niewmierzycka, A., Mills, J., St-Arnaud, R., Dedhar, S., and Reichardt, L.F. (2005). Integrin-Linked Kinase Deletion from Mouse Cortex Results in Cortical Lamination Defects Resembling Cobblestone Lissencephaly. *J. Neurosci.* *25*, 7022–7031.
- Oakley, C., and Brunette, D.M. (1993). The sequence of alignment of microtubules, focal contacts and actin filaments in fibroblasts spreading on smooth and grooved titanium substrata. *J. Cell Sci.* *106 ( Pt 1)*, 343–354.

- Oh, S., Brammer, K.S., Li, Y.S.J., Teng, D., Engler, A.J., Chien, S., and Jin, S. (2009). Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 2130–2135.
- Ori-McKenney, K.M., Jan, L.Y., and Jan, Y.-N. (2012). Golgi Outposts Shape Dendrite Morphology by Functioning as Sites of Acentrosomal Microtubule Nucleation in Neurons. *Neuron* *76*, 921–930.
- Pancoast, M., Dobyns, W., and Golden, J.A. (2005). Interneuron deficits in patients with the Miller-Dieker syndrome. *Acta Neuropathol.* *109*, 400–404.
- Pankov, R., Endo, Y., Even-Ram, S., Araki, M., Clark, K., Cukierman, E., Matsumoto, K., and Yamada, K.M. (2005). A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. *J. Cell Biol.* *170*, 793–802.
- Pankova, Rösel, A.D., Novotn, A.M., and Brábek, J. (2010). The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol. Life Sci.* *67*, 63–71.
- Paridaen, J., and Huttner, W.B. (2014). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep.* *15*, 351–364.
- Park, J., Kim, H.-N., Kim, D.-H., Levchenko, A., and Suh, K.-Y. (2012). Quantitative analysis of the combined effect of substrate rigidity and topographic guidance on cell morphology. *IEEE Trans. Nanobioscience* *11*, 28–36.
- Park, J.S., Kim, D.H., Kim, H.N., Wang, C.J., Kwak, M.K., Hur, E., Suh, K.Y., An, S.S., and Levchenko, A. (2016). Directed migration of cancer cells guided by the graded texture of the underlying matrix. *Nat. Mater.* *15*, 792–801.
- Parnavelas, J.G., Barfield, J.A., Franke, E., and Luskin, M.B. (1991). Separate progenitor cells give rise to pyramidal and nonpyramidal neurons in the rat telencephalon. *Cereb. Cortex* *1*, 463–468.
- Patel, S., Kurpinski, K., Quigley, R., Gao, H., Hsiao, B.S., Poo, M.-M., and Li, S. (2007). Bioactive Nanofibers: Synergistic Effects of Nanotopography and Chemical Signaling on Cell Guidance. *Nano Lett.* *7*, 2122–2128.
- Pelham, R.J., and Wang, Y. I (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 13661–13665.
- Petilla Interneuron Nomenclature Group, Ascoli, G.A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S.A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., Buzsáki, G., Cauli, B., Defelipe, J., et al. (2008). Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 557–568.
- Petrie, R.J., Doyle, A.D., and Yamada, K.M. (2009). Random versus directionally persistent cell migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 538–549.
- Petrie, R.J., Gavara, N., Chadwick, R.S., and Yamada, K.M. (2012). Nonpolarized signaling reveals two distinct modes of 3D cell migration. *J. Cell Biol.* *197*, 439–455.
- Peyton, S.R., and Putnam, A.J. (2005). Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion. *J. Cell. Physiol.* *204*, 198–209.
- Pitaval, A., Tseng, Q., Bornens, M., and Théry, M. (2010). Cell shape and contractility regulate ciliogenesis in cell cycle-arrested cells. *J. Cell Biol.* *191*, 303–312.
- Pla, R., Borrell, V., Flames, N., and Marín, O. (2006). Layer acquisition by cortical GABAergic interneurons is independent of Reelin signaling. *J. Neurosci.* *26*, 6924–6934.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell* *112*, 453–465.

- Polleux, F., Whitford, K.L., Dijkhuizen, P.A., Vitalis, T., and Ghosh, A. (2002). Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development* *129*, 3147–3160.
- Pouthas, F., Girard, P., Lecaudey, V., Ly, T.B.N., Gilmour, D., Boulin, C., Pepperkok, R., and Reynaud, E.G. (2008). In migrating cells, the Golgi complex and the position of the centrosome depend on geometrical constraints of the substratum. *J. Cell Sci.* *121*, 2406–2414.
- Powell, E.M., Mars, W.M., and Levitt, P. (2001). Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Is a Motogen for Interneurons Migrating from the Ventral to Dorsal Telencephalon. *Neuron* *30*, 79–89.
- Pozas, E., and Ibáñez, C.F. (2005). GDNF and GFRalpha1 promote differentiation and tangential migration of cortical GABAergic neurons. *Neuron* *45*, 701–713.
- Provenzano, P.P., Eliceiri, K.W., Campbell, J.M., Inman, D.R., White, J.G., and Keely, P.J. (2006). Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med.* *4*, 38.
- Provenzano, P.P., Inman, D.R., Eliceiri, K.W., Knittel, J.G., Yan, L., Rueden, C.T., White, J.G., and Keely, P.J. (2008). Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Med.* *6*, 11.
- Raab, M., Gentili, M., De Belly, H., Thiam, H.-R., Vargas, P., Jimenez, A.J., Lautenschlaeger, F., Voituriez, R., Lennon-Duménil, A.-M., Manel, N., et al. (2016). ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death. *Science* (80- ). *352*, 359–362.
- Rajnicek, A., and McCaig, C. (1997). Guidance of CNS growth cones by substratum grooves and ridges: effects of inhibitors of the cytoskeleton, calcium channels and signal transduction pathways. *J. Cell Sci.* *110* ( Pt 23), 2915–2924.
- Rajnicek, A., Britland, S., and McCaig, C. (1997). Contact guidance of CNS neurites on grooved quartz: influence of groove dimensions, neuronal age and cell type. *J. Cell Sci.* *110* ( Pt 23), 2905–2913.
- Ray, A., Lee, O., Win, Z., Edwards, R.M., Alford, P.W., Kim, D.-H., and Provenzano, P.P. (2017). Anisotropic forces from spatially constrained focal adhesions mediate contact guidance directed cell migration. *Nat. Commun.* *8*.
- Renault, R., Durand, J.-B., Viovy, J.-L., and Villard, C. (2016). Asymmetric axonal edge guidance: a new paradigm for building oriented neuronal networks. *Lab Chip* *16*, 2188–2191.
- Riccio, O., Potter, G., Walzer, C., Vallet, P., Szabó, G., Vutskits, L., Kiss, J., and Dayer, A. (2009). Excess of serotonin affects embryonic interneuron migration through activation of the serotonin receptor 6. *Mol. Psychiatry* *1489*, 280–290.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* *302*, 1704–1709.
- Rolli, C.G., Seufferlein, T., Kemkemer, R., and Spatz, J.P. (2010). Impact of Tumor Cell Cytoskeleton Organization on Invasiveness and Migration: A Microchannel-Based Approach. *PLoS One* *5*, e8726.
- Rorth, P. (2011). Perspective Whence Directionality: Guidance Mechanisms in Solitary and Collective Cell Migration. *Dev. Cell* *20*, 9–18.
- Rubin, A.N., Alfonsi, F., Humphreys, M.P., Choi, C.K.P., Rocha, S.F., and Kessaris, N. (2010). The Germinal Zones of the Basal Ganglia But Not the Septum Generate GABAergic Interneurons for the Cortex. *J. Neurosci.* *30*, 12050–12062.
- Ruprecht, V., Monzo, P., Ravasio, A., Yue, Z., Makhija, E., Strale, P.O., Gauthier, N., Shivashankar, G. V, Studer, V., Albiges-Rizo, C., et al. (2017). How cells respond to environmental cues – insights from bio-functionalized substrates. *J. Cell Sci.* *130*, 51–61.

- Sahara, S., Yanagawa, Y., O'Leary, D.D.M., and Stevens, C.F. (2012). The fraction of cortical GABAergic neurons is constant from near the start of cortical neurogenesis to adulthood. *J. Neurosci.* *32*, 4755–4761.
- Sánchez-Alcañiz, J.A., Haege, S., Mueller, W., Pla, R., Mackay, F., Schulz, S., López-Bendito, G., Stumm, R., and Marín, O. (2011). Cxcr7 Controls Neuronal Migration by Regulating Chemokine Responsiveness. *Neuron* *69*, 77–90.
- Sapir, T., Elbaum, M., and Reiner, O. (1997). Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *EMBO J.* *16*, 6977–6984.
- Satz, J.S., Ostendorf, A.P., Hou, S., Turner, A., Kusano, H., Lee, J.C., Turk, R., Nguyen, H., Ross-Barta, S.E., Westra, S., et al. (2010). Distinct functions of glial and neuronal dystroglycan in the developing and adult mouse brain. *J. Neurosci.* *30*, 14560–14572.
- Schaar, B.T., and McConnell, S.K. (2005). Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 13652–13657.
- Seonwoo, H., Bae, W.-G., Park, S., Kim, H.-N., Choi, K.S., and Lim, K.T. (2016). Hierarchically Micro- and Nanopatterned Topographical Cues for Modulation of Cellular Structure and Function. *IEEE Trans. Nanobioscience* *15*, 835–842.
- Shinohara, R., Thumkeo, D., Kamijo, H., Kaneko, N., Sawamoto, K., Watanabe, K., Takebayashi, H., Kiyonari, H., Ishizaki, T., Furuyashiki, T., et al. (2012). A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in tangential migration of interneuron precursors. *Nat. Publ. Gr.* *15*.
- Shu, T., Ayala, R., Nguyen, M.-D., Xie, Z., Gleeson, J.G., and Tsai, L.-H. (2004). Ndel1 operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning. *Neuron* *44*, 263–277.
- Silva, C.G., Métin, C., Fazeli, W., Machado, N.J., Darmopil, S., Launay, P.-S., Ghestem, A., Nesa, M.-P., Bassot, E., Szabó, E., et al. (2013). Adenosine receptor antagonists including caffeine alter fetal brain development in mice. *Sci. Transl. Med.* *5*, 197ra104.
- Silva, C.G., Peyre, E., Adhikari, M.H., Tielens, S., Tanco, S., Van Damme, P., Magno, L., Krusy, N., Agirman, G., Magiera, M.M., et al. (2018). Cell-Intrinsic Control of Interneuron Migration Drives Cortical Morphogenesis. *Cell* *172*, 1063–1078.e19.
- Snappyan, M., Lemasson, M., Brill, M.S., Blais, M., Massouh, M., Ninkovic, J., Gravel, C., Berthod, F., Götz, M., Barker, P.A., et al. (2009). Vasculature Guides Migrating Neuronal Precursors in the Adult Mammalian Forebrain via Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling. *J. Neurosci.* *29*, 4172–4188.
- Solecki, D.J., Model, L., Gaetz, J., Kapoor, T.M., and Hatten, M.E. (2004). Par6alpha signaling controls glial-guided neuronal migration. *Nat. Neurosci.* *7*, 1195–1203.
- Sousa, V.H., Miyoshi, G., Hjerling-Leffler, J., Karayannis, T., and Fishell, G. (2009). Characterization of Nkx6-2-Derived Neocortical Interneuron Lineages. *Cereb. Cortex* July *19*, 1–10.
- Stanco, A., Szekeres, C., Patel, N., Rao, S., Campbell, K., Kreidberg, J.A., Polleux, F., and Anton, E.S. (2009). Netrin-1-alpha3beta1 integrin interactions regulate the migration of interneurons through the cortical marginal zone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 7595–7600.
- Stevens, H.E., Su, T., Yanagawa, Y., and Vaccarino, F.M. (2013). Prenatal stress delays inhibitory neuron progenitor migration in the developing neocortex. *Psychoneuroendocrinology* *38*, 509–521.
- Stiles, J., and Jernigan, T.L. (2010). The Basics of Brain Development. *Neuropsychol. Rev.* *20*, 327–348.

- Stroka, K.M., and Aranda-Espinoza, H. (2009). Neutrophils Display Biphasic Relationship Between Migration and Substrate Stiffness. *Cell Motil. Cytoskelet.* *66*, 328–341.
- Stumm, R.K., Zhou, C., Ara, T., Lazarini, F., Dubois-Dalcq, M., Nagasawa, T., Höllt, V., and Schulz, S. (2003). CXCR4 Regulates Interneuron Migration in the Developing Neocortex. *J. Neurosci.* *23*, 5123–5130.
- Sultan, K.T., Han, Z., Zhang, X.-J., Xianyu, A., Li, Z., Huang, K., and Shi, S.-H. (2016). Clonally Related GABAergic Interneurons Do Not Randomly Disperse but Frequently Form Local Clusters in the Forebrain. *Neuron* *92*, 31–44.
- Svitkina, T.M., and Borisy, G.G. (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol.* *145*, 1009–1026.
- Tamamaki, N., Fujimori, K.E., and Takauji, R. (1997). Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J. Neurosci.* *17*, 8313–8323.
- Tan, J., and Saltzman, W.M. (2002). Topographical control of human neutrophil motility on micropatterned materials with various surface chemistry. *Biomaterials* *23*, 3215–3225.
- Tan, S.S., and Breen, S. (1993). Radial mosaicism and tangential cell dispersion both contribute to mouse neocortical development. *Nature* *362*, 638–640.
- Tan, X., Liu, W.A., Zhang, X.-J., Shi, W., Ren, S.-Q., Li, Z., Brown, K.N., and Shi, S.-H. (2016). Vascular Influence on Ventral Telencephalic Progenitors and Neocortical Interneuron Production. *Dev. Cell* *36*, 624–638.
- Tanaka, D., Nakaya, Y., Yanagawa, Y., Obata, K., and Murakami, F. (2003). Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins. *Development* *130*, 5803–5813.
- Tanaka, D.H., Maekawa, K., Yanagawa, Y., Obata, K., and Murakami, F. (2006). Multidirectional and multizonal tangential migration of GABAergic interneurons in the developing cerebral cortex. *Development* *133*, 2167–2176.
- Tanaka, D.H., Yanagida, M., Zhu, Y., Mikami, S., Nagasawa, T., Miyazaki, J., Yanagawa, Y., Obata, K., and Murakami, F. (2009). Random walk behavior of migrating cortical interneurons in the marginal zone: time-lapse analysis in flat-mount cortex. *J. Neurosci.* *29*, 1300–1311.
- Tang, Q.Y., Qian, W.X., Xu, Y.H., Gopalakrishnan, S., Wang, J.Q., Lam, Y.W., and Pang, S.W. (2015). Control of cell migration direction by inducing cell shape asymmetry with patterned topography. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* *103*, 2383–2393.
- Teixeira, A.I., Abrams, G.A., Bertics, P.J., Murphy, C.J., and Nealey, P.F. (2003). Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates. *J. Cell Sci.* *116*, 1881–1892.
- Teixeira, A.I., Nealey, P.F., and Murphy, C.J. (2004). Responses of human keratocytes to micro- and nanostructured substrates. *J. Biomed. Mater. Res. A* *71*, 369–376.
- Teixeira, A.I., Mckie, G.A., Foley, J.D., Bertics, P.J., Nealey, P.F., and Murphy, C.J. (2006). The effect of environmental factors on the response of human corneal epithelial cells to nanoscale substrate topography. *Biomaterials* *27*, 3945–3954.
- Teo, B.K.K., Wong, S.T., Lim, C.K., Kung, T.Y.S., Yap, C.H., Ramagopal, Y., Romer, L.H., and Yim, E.K.F. (2013). Nanotopography modulates mechanotransduction of stem cells and induces differentiation through focal adhesion kinase. *ACS Nano* *7*, 4785–4798.

- Théry, M. (2010). Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *J. Cell Sci.* *123*, 4201–4213.
- Théry, M., Racine, V., Piel, M., Pé, A., Dimitrov, A., Chen, Y., Sibarita, J.-B., and Bornens, M. (2006). Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *PNAS* *103*, 19771–19776.
- Thiam, H.-R., Vargas, P., Carpi, N., Crespo, C.L., Raab, M., Terriac, E., King, M.C., Jacobelli, J., Alberts, A.S., Stradal, T., et al. (2016). Perinuclear Arp2/3-driven actin polymerization enables nuclear deformation to facilitate cell migration through complex environments. *Nat. Commun.* *7*.
- Thomas Parsons, J., Rick Horwitz, A., and Schwartz, M.A. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat. Publ. Gr.* *11*.
- Tiveron, M.-C., Rossel, M., Moepps, B., Zhang, Y.L., Seidenfaden, R., Favor, J., König, N., and Cremer, H. (2006). Molecular Interaction between Projection Neuron Precursors and Invading Interneurons via Stromal-Derived Factor 1 (CXCL12)/CXCR4 Signaling in the Cortical Subventricular Zone/Intermediate Zone. *J. Neurosci.* *26*, 13273–13278.
- Tivodar, S., Kalemaki, K., Kounoupa, Z., Vidaki, M., Theodorakis, K., Denaxa, M., Kessarlis, N., De Curtis, I., Pachnis, V., and Karagogeos, D. (2015). Rac-GTPases Regulate Microtubule Stability and Axon Growth of Cortical GABAergic Interneurons. *Cereb. Cortex* *25*, 2370–2382.
- Tozluoglu, M., Tournier, A.L., Jenkins, R.P., Hooper, S., Bates, P.A., and Sahai, E. (2013). Matrix geometry determines optimal cancer cell migration strategy and modulates response to interventions. *Nat. Cell Biol.* *15*, 751–762.
- Trentini, J.F., Timothy, J., Neill, O., Poluch, S., Juliano, S.L., and O'Neill, J.T. (2016). Prenatal carbon monoxide impairs migration of interneurons into the cerebral cortex. *177*.
- Tsai, J.-W., Bremner, H., and Vallee, R.B. (2007). Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue. *Nat. Neurosci.* *10*, 970–979.
- Tzvetkova-Chevolleau, T., Stéphanou, A., Fuard, D., Ohayon, J., Schiavone, P., and Tracqui, P. (2008). The motility of normal and cancer cells in response to the combined influence of the substrate rigidity and anisotropic microstructure. *Biomaterials* *29*, 1541–1551.
- Umeshima, H., Hirano, T., and Kengaku, M. (2007). Microtubule-based nuclear movement occurs independently of centrosome positioning in migrating neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 16182–16187.
- Uttayarat, P., Chen, M., Li, M., Allen, F.D., Composto, R.J., and Lelkes, P.I. (2008). Microtopography and flow modulate the direction of endothelial cell migration. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *294*, H1027–35.
- Valcanis, H., and Tan, S.-S. (2003). Layer Specification of Transplanted Interneurons in Developing Mouse Neocortex. *J. Neurosci.* *23*, 5113–5122.
- Valiente, M., and Martini, F.J. (2009). Migration of cortical interneurons relies on branched leading process dynamics. *Cell Adh. Migr.* *3*, 278–280.
- Vitalis, T., and Rossier, J. (2011). New insights into cortical interneurons development and classification: contribution of developmental studies. *Dev. Neurobiol.* *71*, 34–44.
- Wang, N., Tytell, J.D., and Ingber, D.E. (2009). Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 75–82.

- Wang, Y., Li, G., Stanco, A., Long, J.E., Crawford, D., Potter, G.B., Pleasure, S.J., Behrens, T., and Rubenstein, J.L.R. (2011). CXCR4 and CXCR7 Have Distinct Functions in Regulating Interneuron Migration. *Neuron* *69*, 61–76.
- Ward, M.E., Jiang, H., and Rao, Y. (2005). Regulated formation and selection of neuronal processes underlie directional guidance of neuronal migration. *Mol. Cell. Neurosci.* *30*, 378–387.
- Watanabe, T., Noritake, J., and Kaibuchi, K. (2005). Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol.* *15*, 76–83.
- Weiss, P. (1934). In vitro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber. *J. Exp. Zool.* *68*, 393–448.
- Weiss, P. (1947). The problem of specificity in growth and development. *Yale J. Biol. Med.* *19*, 235–278.
- Whitman, M.C., Fan, W., Relat, L., Rodriguez-Gil, D.J., and Greer, C.A. (2009). Blood vessels form a migratory scaffold in the rostral migratory stream. *J. Comp. Neurol.* *516*, 94–104.
- Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J.M., Herrera, D.G., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. *Nat. Neurosci.* *2*, 461–466.
- Wichterle, H., Turnbull, D.H., Nery, S., Fishell, G., and Alvarez-Buylla, A. (2001). In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* *128*.
- Wichterle, H., Alvarez-Dolado, M., Erskine, L., and Alvarez-Buylla, A. (2003). Permissive corridor and diffusible gradients direct medial ganglionic eminence cell migration to the neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 727–732.
- Wilson, K., Lewalle, A., Fritzsche, M., Thorogate, R., Duke, T., and Charras, G. (2013). Mechanisms of leading edge protrusion in interstitial migration. *Nat. Commun.* *4*, 2896.
- Wittmann, T., and Waterman-Storer, C.M. (2001). Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J. Cell Sci.* *114*, 3795–3803.
- Wojciak-Stothard, B., Madeja, Z., Korohoda, W., Curtis, A., and Wilkinson, C. (1995a). Activation of macrophage-like cells by multiple grooved substrata. Topographical control of cell behaviour. *Cell Biol. Int.* *19*, 485–490.
- Wojciak-Stothard, B., Curtis, A.S.G., Monaghan, W., Mcgrath, M., Sommer, I., Wil, C.D.W., and Nson, K. (1995b). Role of the Cytoskeleton in the Reaction of Fibroblasts to Multiple Grooved Substrata. *Cell Motil. Cytoskeleton* *31*, 147–158.
- Wonders, C.P., Taylor, L., Welagen, J., Mbata, I.C., Xiang, J.Z., and Anderson, S.A. (2008). A spatial bias for the origins of interneuron subgroups within the medial ganglionic eminence. *Dev. Biol.* *314*, 127–136.
- Wong, S.T., Teo, S.-K., Park, S., Chiam, K.-H., Yim, E.K.F., Wong, S.T., Teo, S.-K., Chiam, K.-H., Park, S., and Yim, E.K.F. (2014). Anisotropic rigidity sensing on grating topography directs human mesenchymal stem cell elongation. *Biomech Model Mechanobiol* *13*, 27–39.
- Wu, Y.I., Frey, D., Lungu, O.I., Jaehrig, A., Schlichting, I., Kuhlman, B., and Hahn, K.M. (2009). A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature* *461*.
- Xu, Q., Cobos, I., De, E., Cruz, L., Rubenstein, J.L., and Anderson, S.A. (2004). Origins of Cortical Interneuron Subtypes. *J. Neurosci.* *24*, 2612–2622.

- Yanagida, M., Miyoshi, R., Toyokuni, R., Zhu, Y., and Murakami, F. (2012). Dynamics of the leading process, nucleus, and Golgi apparatus of migrating cortical interneurons in living mouse embryos. *109*, 16737–16742.
- Yang, Y., Wang, K., Gu, X., and Leong, K.W. (2017). Biophysical Regulation of Cell Behavior—Cross Talk between Substrate Stiffness and Nanotopography. *Eng.* 3, 36–54.
- Yao, L., Wang, S., Cui, W., Sherlock, R., O'Connell, C., Damodaran, G., Gorman, A., Windebank, A., and Pandit, A. (2008). Effect of functionalized micropatterned PLGA on guided neurite growth. *Acta Biomater.* 5, 580–588.
- Yau, H.-J., Wang, H.-F., Lai, C., and Liu, F.-C. (2003). Neural development of the neuregulin receptor ErbB4 in the cerebral cortex and the hippocampus: preferential expression by interneurons tangentially migrating from the ganglionic eminences. *Cereb. Cortex* 13, 252–264.
- Yeung, T., Georges, P.C., Flanagan, L.A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V., and Janmey, P.A. (2005). Effects of Substrate Stiffness on Cell Morphology, Cytoskeletal Structure, and Adhesion. *Cell Motil. Cytoskeleton* 60, 24–34.
- Yim, E.K.F., Reano, R.M., Pang, S.W., Yee, A.F., Chen, C.S., and Leong, K.W. (2005). Nanopattern-induced changes in morphology and motility of smooth muscle cells. *Biomaterials* 26, 5405–5413.
- Yokota, Y., Gashghaei, H.T., Han, C., Watson, H., Campbell, K.J., and Anton, E.S. (2007). Radial glial dependent and independent dynamics of interneuronal migration in the developing cerebral cortex. *PLoS One* 2, e794.
- Yoshida, K., and Soldati, T. (2006). Dissection of amoeboid movement into two mechanically distinct modes. *J. Cell Sci.* 119, 3833–3844.
- Yozu, M., Tabata, H., and Nakajima, K. (2005). The Caudal Migratory Stream: A Novel Migratory Stream of Interneurons Derived from the Caudal Ganglionic Eminence in the Developing Mouse Forebrain. *J. Neurosci.* 25, 268–277.
- Yu, X., and Bellamkonda, R. V (2001). Dorsal root ganglia neurite extension is inhibited by mechanical and chondroitin sulfate-rich interfaces. *J. Neurosci. Res.* 66, 303–310.
- Zaidel-Bar, R., and Geiger, B. (2010). The switchable integrin adhesome. *J. Cell Sci.* 123, 1385–1388.
- Zarbalis, K., Choe, Y., Siegenthaler, J.A., Orosco, L.A., and Pleasure, S.J. (2012). Meningeal defects alter the tangential migration of cortical interneurons in *Foxc1<sup>hith/hith</sup>* mice. *Neural Dev.* 7, 2.
- Zechel, S., Nakagawa, Y., and Ibáñez, C.F. (2016). Thalamo-cortical axons regulate the radial dispersion of neocortical GABAergic interneurons. *Elife* 5.
- Zhou, F., Yuan, L., Huang, H., and Chen, H. (2009). Phenomenon of contact guidance on the surface with nano-micro-groove-like pattern and cell physiological effects. *Chinese Sci. Bull.* 54, 3200–3205.
- Zhu, Y., Li, H.-S., Zhou, L., Wu, J.Y., and Rao, Y. (1999a). Cellular and Molecular Guidance of GABAergic Neuronal Migration from an Extracortical Origin to the Neocortex. *Neuron* 23, 473–485.
- Zhu, Y., Li, H.-S., Zhou, L., Wu, J.Y., and Rao, Y. (1999b). Cellular and Molecular Guidance of GABAergic Neuronal Migration from an Extracortical Origin to the Neocortex. *Neuron* 23, 473–485.
- Zimmerman, B., Volberg, T., and Geiger, B. (2004). Early Molecular Events in the Assembly of the Focal Adhesion-Stress Fiber Complex During Fibroblast Spreading. *Cell Motil. Cytoskeleton* 58, 143–159.
- Zimmer, G., Garcez, P., Rudolph, J., Niehage, R., Weth, F., Lent, R., and Bolz, J. (2008). Ephrin-A5 acts as a repulsive cue for migrating cortical interneurons. *Eur. J. Neurosci.* 28, 62–73.

Zimmer, G., Rudolph, J., Landmann, J., Gerstmann, K., Steinecke, A., Gampe, C., and Bolz, J. (2011). Bidirectional ephrinB3/EphA4 signaling mediates the segregation of medial ganglionic eminence- and preoptic area-derived interneurons in the deep and superficial migratory stream. *J. Neurosci.* *31*, 18364–18380.

# Annexes



## Annexe 1 –Tableau récapitulatif des différentes études sur l'influence de la topographie sur les comportements cellulaires

Type de relief	Taille des structures	Matériel/coating	Type de cellule	Réponse cellulaire	Elément(s) du cytosquelette impliqué(s)	Référence
Nano-rugosités	Ra 18 à 201nm	Silicone	Cellules corticales de rat	Rugosité optimale de 60nm pour l'adhésion et la survie cellulaire		Khan et al., 2005
Nano-cratères	Profondeur 350nm, diamètre 1µm gradients d'écartement 2 à 8µm	Quartz	Fibroblastes NIH3T3	Faible densité cellulaire dans les zones denses en cratères, migration vers les zones moins denses	Nombre et morphologies des adhésions focales dépendent de la densité des cratères	Jeon et al., 2015
Tranchées	Tranchées profondeur 5µm, largeur et écartement 5 à 75µm.	Polycarbonate coating fibronectine	Myoblastes	Alignement dans la direction des tranchées, et décroissant avec l'augmentation de la largeur (optimal 10µm)		Charest et al., 2007
Tranchées	Profondeur 150 ou 600nm, largeur et écartement 70nm à 2µm,	Silicone	Cellules épithéliales de cornée humaines	Alignement dès 70nm de largeur, augmente avec la profondeur des tranchées	L'alignement ne dépend pas des AF et fibres de stress. La largeur des AF dépend de la largeur des crêtes	Teixeira et al., 2003
Tranchées	Profondeur 600nm. Largeur tranchée + crête de 400 à 4000nm	Silicone	Cellules épithéliales de cornée humaine	Largeur 400nm : alignement perpendiculaire, largeur 2-4µm : alignement parallèle à la direction des tranchées	Largeur 400nm, 2-4µm (alignement perpendiculaire et parallèle), AF obliques. Largeur 1200nm, AF parallèles aux tranchées. La largeur de ces AF ont la même largeur que celle des tranchées	Teixeira et al., 2006
Tranchées	Profondeur 0,3 à 6µm, largeur de 0,9 à 9,7 µm. Rapports d'aspect (ratio profondeur/largeur) de 0,19 à 2µm	PDMS	Cellules souches mésenchymateuses humaines	Alignement dépend du rapport d'aspect des tranchées, important pour des RA proches de 1		Wong et al., 2014

Annexe 1 Tableau récapitulatif de l'influence de la topographie sur les comportements cellulaires

Tranchées	Profondeur 100nm à 1µm, largeur 0,1 à 10µm. Variations du rapport d'aspect des structures (0 à 0,5)	Polymère TCP	Fibroblastes humains	Augmentation de l'alignement et de l'élongation avec l'augmentation du rapport d'aspect des structures		Crouch et al., 2008
Tranchées	Profondeur 3 ou 5µm, largeur tranchées 6 à 14µm, largeur crêtes 2µm	Polyimide sur du verre + fine couche de métal Au-Pd ou titanium	Neutrophiles humains	Elongation plus importante sur des tranchées étroites et profondes. Vitesse de migration augmentée sur les tranchées, variation biphasique avec la largeur.		Tan & Saltzman 2002
Tranchées	Largeur tranchée + largeur crête 400nm à 4µm	Polyuréthane	Cellules épithéliales de cornée humaines	Alignement et migration le long des tranchées. Pas d'effet significatif sur la vitesse		Diehl et al., 2005
Tranchées	Profondeur 1-5µm, largeur tranchées/crêtes 1, 2, 5, 10µm	Polystyrène coating fibronectine	Cellules épithéliales de cornée	Migration dans la direction des tranchées		Dalton et al., 2001
Tranchées	Profondeur et largeur 350µm, écartement 700nm	PMMA ou PDMS	Cellules de muscles lisses	Alignement dans la direction des tranchées. Polarisation plus rapide que sur du plat		Yim et al., 2005
Tranchées	Profondeur 400nm, largeur tranchée 1 à 9µm, largeur crête 1µm (gradient de densité)	Résine PUA coating fibronectine	Fibroblastes	Fort alignement dans les zones denses en tranchées. Migration dans la direction des tranchées (court terme) et dans la direction du gradient (long terme). Vitesses maximales dans zones densité intermédiaires	Alignement des filaments d'actine et des AF dans la direction et sur le bord des tranchées dans les zones denses	Kim et al., 2009
Tranchées	Profondeur 3µm, largeur tranchée et crête 15µm	Titane	Fibroblastes humains	Alignement et élongation dans la direction des tranchées	Alignement des MTs en premier, puis filaments d'actine et AF	Oakley & Brunette, 1993
Tranchées	Profondeur 0,5, 1, 2, 5µm, largeur 5, 10, 25µm.	Silicium et résine photosensible	Fibroblastes	Alignement le long des tranchées, augmente avec la profondeur	Accumulation rapide d'actine et d'AF le long des tranchées. A plus long terme, actine et MTs impliqués dans l'alignement. Cytochalasine réduit l'élongation et l'orientation. Taxol réduit l'élongation mais pas l'orientation	Wojciak-Stothard et al., 1995

Annexe 1 Tableau récapitulatif de l'influence de la topographie sur les comportements cellulaires

Tranchées	Profondeur 0,5µm, largeur tranchée/ crête 2-5-10µm	PDMS	Fibroblastes		AF surtout présentes sur les crêtes. Orientations multiples pour largeurs 5 et 10µm, le long des crêtes de largeur 2µm	Den Braber et al., 1998
Tranchées	Profondeur 0,5 à 1,5µm, largeur tranchée et crête 1 à 10µm	Polystyrène coating PLA	Cellules de moelle osseuse de rat		Alignement des fibres d'actine dans la direction des tranchées. Pour largeur tranchée 1 et 2µm : AF sur les crêtes. Pour largeur 5 et 10µm également dans les tranchées	Matsuzaka et al., 2000
Tranchées	Profondeur 50-150nm. Largeur tranchée + crête 500nm	Silicone	Ostéoblastes	Alignement dans la direction des tranchées, augmente avec la profondeur	Actine et actinine orientés dans la direction des tranchées	Lenhert et al., 2004
Tranchées	Profondeur 600nm, largeur tranchée + crête 400 à 4000nm	Silicone	Kératocytes	Alignement dans la direction des tranchées	Sur les tranchées de périodicité nanométrique (<2000nm), moins d'AF et de fibres de stress, alignées le long des tranchées	Teixeira et al., 2004
Tranchées	Toutes dimensions 600nm	PDMS coating fibronectine	Cellules souches embryonnaires humaines	Alignement le long des tranchées	Alignement de l'actine, MTs et filaments intermédiaires. Drogues anti actine perturbent l'alignement	Gerecht et al., 2007
Tranchées	Profondeur 330nm, largeur 10, 25, 100µm	Résine photosensible	Ostéoblastes humains	Alignement dans la direction des tranchées, diminue quand la largeur augmente	Largeur 25µm : alignement des fibres d'actine dans la direction des tranchées. Largeur 10µm : alignement parallèle et perpendiculaire de l'actine. Réseau de MTs dans la direction du relief. AF sur les crêtes, parallèle ou perpendiculaire au relief	Biggs et al., 2008
Tranchées	Largeur tranchées 250nm à 10µm	PDMS	Cellules souches mésenchymateuses humaines	Alignement dans la direction des tranchées	Alignement des fibres d'actine dans la direction des tranchées. Blebbistatine réduit l'alignement. AF plus petites mais plus allongées sur les tranchées étroites	Teo et al., 2013

**Annexe 1 Tableau récapitulatif de l'influence de la topographie sur les comportements cellulaires**

Tranchées	Profondeur 600nm, largeur et écartement 800nm	NOA (Norland optical adhésive) sur lamelle de verre coating collagène	Différentes lignées de cellules de carcinome	Alignement et migration directionnelle dans la direction des tranchées	Les tranchées contraignent l'orientation des AF qui s'alignent dans la direction du relief. Relation entre la largeur des AF et celle des tranchées. Conduit à une migration directionnelle par génération forces anisotropiques	Ray et al., 2017
Tranchées	2 séries de tranchées de directions perpendiculaires . Profondeur 1µm, largeur tranchées et crêtes 15µm	Résine époxy	Fibroblastes/ cellules épithéliales	Les cellules tournent aux intersections, morphologies en L ou T	Aux intersections, les MTs s'adaptent parfaitement au relief, l'actine s'aligne dans 1 des 2 directions.	Hamilton et al., 2009
Tranchées	Profondeur 600nm, largeur tranchée 550-1650-2750 nm, largeur crête 550nm	Polymère PUA	Cellules souches mésenchymateuses humaines	Elongation de la cellule et du noyau le long des tranchées, plus importante quand la densité structures diminue. Vitesse de migration augmentée sur les tranchées	AF et actine le long des crêtes. AF polarisées dans la direction des tranchées. Taille des AF plus importante sur une topographie moins dense	Kim et al., 2013
Tranchées	Profondeur 500nm, largeur tranchée 700nm, largeur crête 350nm	Précurseur PUA coating ICAM-1	Cellules T	Alignement cellulaire et extension des lamellipodes dans la direction des tranchées. Migration directionnelle	Latrunculine, mais pas blebbistatine supprime le mouvement directionnel	Kwon et al., 2012
Tranchées ou plots	Profondeur 1µm, largeur tranchée 4µm, espacement 6µm. Plots côtés 10µm, hauteur 1µm	PDMS	Ostéoblastes de souris	Migration aléatoire sur les plots, directionnelles et plus rapide sur les tranchées, dans la direction du relief	Sur les tranchées, alignement des fibres d'actine dans la direction du relief. Formation préférentielle des AF le long du bord des tranchées. Mais plus d'AF sur les plots	Tang et al., 2014
Plots	1,7µm de haut, 10µm de diamètre, 15µm d'écartement centre à centre	Polystyrène coating fibronectine	Fibroblastes	Mouvement rapide mais aléatoire sur plots. Morphologie plus branchée	Adhésions focales plus petites et plus stables sur les plots. Implication de la myosine II. Pas de réponse au relief pour cellules FAK-/-	Frey et al., 2006

Annexe 1 Tableau récapitulatif de l'influence de la topographie sur les comportements cellulaires

Plots	Hauteur 2 à 10µm, diamètre 5 à 10µm, espacement 5 à 10µm	PDMS coating fibronectine	Fibroblastes	Cellules plus branchées sur les plots, vitesses de migration diminuées, mais mouvement plus persistant que sur le plat	Moins de fibres de stress et d'AF sur les plots, mais augmentation de leur taille et temps de vie par rapport au plat. Blebbistatine augmente directionnalité du mouvement, cellules plus allongées	Ghibaudo et al., 2009
Fibres	Diamètre de 80 à 740nm	PLGA	Fibroblastes	Alignement dans la direction des fibres, particulièrement pour les grands diamètres		Chaurey et al., 2012
Fibres	Fibres alignées ou non, diamètre 0,16 à 8µm	PMMA coating fibronectine	Fibroblastes humains	Elongation le long des fibres (pour d>1µm)	Fibres de petit diamètre : AF distribuées de manière homogène. Grand diamètre : le long des fibres	Liu et al., 2009
Fibres	Nano-fibres alignées ou non	PLLA coating laminine et FGF	Fibroblastes dermiques	Migration après blessure plus rapide quand les fibres sont alignées		Patel et al., 2007

## Annexe 2 – Tableau récapitulatif des différentes études sur l'influence de la topographie sur le guidage axonal

Type de relief	Taille des structures	Matériel/coating	Type de cellule	Réponse cellulaire	Élément(s) du cytosquelette impliqué(s)	Référence
Tranchées	Profondeur 1/2µm, largeur tranchée 8µm, largeur crêtes 20µm	Perspex et résine photosensible coating Poly-L-lysine (PLL)	Neurones d'embryons de poulet	Pousse axonale le long des tranchées uniquement pour profondeur 2µm		Clark et al., 1990
Tranchées	Profondeur 1-4µm, largeur 10µm, espacement 10-20µm	PDLA/PGLA + laminine	Neurones de ganglions de la racine dorsale	Meilleur alignement pour les tranchées plus profondes et pour l'espacement le plus faible. Pas d'effet sur la vitesse d'élongation		Miller et al., 2002
Tranchées	Profondeur 200nm, largeur 500-750nm	Plastique	Cellules PC12	Réduction de l'alignement et de l'élongation avec l'augmentation de l'espacement		Cecchini et al., 2008
Tranchées	Profondeur 200nm, largeur tranchée + crête 500nm	Plastique	Cellules PC12	Polarisation et pousse axonale dans la direction des tranchées	Les adhésions focales dans la direction de la topographie sont stabilisées. Polarisation dépendante de la myosine II	Ferrari et al., 2010
Tranchées	Profondeur 10µm, largeur 20-60µm	Polyimide photosensible + couche de Au-Pd	Cellules PC12	Les cellules proches du bord de la tranchée y étendent leurs neurites. Augmentation du nombre de neurites pour les tranchées larges		Mahoney et al., 2005
Tranchées	Profondeur 2-3µm, largeur et espacement 5 ou 10µm	PGLA coating laminine/collagène	Cellules PC12	Meilleur alignement pour les plus petites dimensions. Neurites moins longs sur les tranchées		Yao et al., 2008
Tranchées	Profondeur 0,05-0,08µm, largeur 1 à 8µm	Quartz coating PLL et laminine	Neuroblastes de différentes régions du SNC	Extension axone parallèlement ou perpendiculairement aux tranchées. Diminution de l'orientation perpendiculaire avec la largeur. Alignement (toutes directions) augmente avec profondeur		Nagata et al., 1993

Tranchées	Profondeur 400-800nm, largeur 1-2 $\mu$ m	PDMS (coating NGF/laminine)	Neurones d'hippocampe de rat	Les tranchées (surtout largeur 2 $\mu$ m) induisent une forte polarisation. Augmentation de la taille de l'axone pour tranchée largeur 1 $\mu$ m profondeur 800nm	Gomez et al., 2007
Tranchées	Profondeur 14 à 1100nm, largeur 1, 2 ou 4 $\mu$ m	Quartz	Neurones de moelle épinière de xénope/neurones hippocampiques de rat	Elongation neuritique dans la direction des tranchées larges et profondes, perpendiculairement aux tranchées plus étroites	Rajnicek et al., 1997
Tranchées	Profondeur 0,35-0,8-2-4 $\mu$ m, largeur tranchées et crêtes 2 $\mu$ m	PDMS coating PLO et laminine	Progéniteurs neuronaux d'hippocampe de souris	Diminution du branchement des neurites sur les tranchées. Augmentation longueur avec profondeur. Alignement parallèle majoritaire	Chua et al., 2014
Tranchées	Profondeur 2,5 à 69 $\mu$ m, largeur 50 à 350 $\mu$ m,	PDMS + PDL		Les axones traversent les tranchées peu profondes et tournent au bord des profondes ( $h > 10\mu$ m). Dépend également de l'angle d'arrivée des neurites	Li et al., 2005
Plots	Hauteur 1 $\mu$ m diamètre 0,5 ou 2 $\mu$ m Espacement 1,5 à 4,5 $\mu$ m	Silicone coating PLL	Neurones d'hippocampe	Pousse d'un axone bien défini avec les plots. Longueur et alignement neurites plus importants pour espacement entre plots faible (1,5 $\mu$ m)	Dowell-Mesfin et al., 2004
Cônes	Hauteur 1 à 13 $\mu$ m, diamètre 10 à 100 $\mu$ m, espacement 10 à 200 $\mu$ m	PDMS coating PDL	Neurones d'hippocampe	Alignement des neurites pour les plus petites dimensions	Hanson et al., 2009
Pointes	Rayon environ 30nm, espacement environ 200nm	Silicone	Neurones d'hippocampe	Sur les nano-plots : moins de neurites formés, élévation et formation d'un axone plus rapide	Bugnicourt et al., 2014