



**HAL**  
open science

# Rôle de la Sémaphorine 3B dans la neurogenèse de la moelle épinière

Elise Arbeille

► **To cite this version:**

Elise Arbeille. Rôle de la Sémaphorine 3B dans la neurogenèse de la moelle épinière. Neurobiologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10026 . tel-02611941

**HAL Id: tel-02611941**

**<https://theses.hal.science/tel-02611941v1>**

Submitted on 18 May 2020

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

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

## THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole doctorale : BMIC

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 Août 2006)

Soutenue publiquement le 22 février 2013

Par

**Mlle Elise ARBEILLE**

Titre :

**Rôle de la Sémaphorine 3B dans la neurogenèse de la moelle épinière.**

**Directeur de thèse : Dr. Valérie CASTELLANI**

**Jury :**

<b>Pr. Bénédicte DURAND</b>	<b>Présidente</b>
<b>Dr. Sonia GAREL</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Dr. Xavier MORIN</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Dr. Jean-Stéphane JOLY</b>	<b>Examineur</b>
<b>Dr. Valérie CASTELLANI</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>Dr Frédéric MORET</b>	<b>Co-Directeur</b>



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

**M. François-Noël GILLY**

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie

M. le Professeur Philippe LALLE

Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Secrétaire Général

M. Alain HELLEU

## **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles

Administrateur provisoire : M. le Professeur G.

Mérieux

KIRKORIAN

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C.

VINCIGUERRA.

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

Biologie Humaine





## **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme le Professeur H. PARROT
Département GEP	Directeur : M. N. SIAUVE
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : Mme S. FLECK
Département Sciences de la Terre	Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. C. COLLIGNON
Observatoire de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. C. VITON
Institut Universitaire de Formation des Maîtres	Directeur : M. R. BERNARD
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : Mme la Professeure V. MAUME- DESCHAMPS



Je souhaite tout d'abord remercier le Dr. Sonia Garel et le Dr. Xavier Morin d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse. Je remercie également le Dr Jean-Stéphane Joly, qui a participé à mon comité de thèse, d'avoir accepté d'examiner une dernière fois mon travail ainsi que le Pr. Bénédicte Durand d'être présente dans mon jury de thèse.

Ces quatre dernières années m'ont permis de réaliser un projet qui me tenait à cœur depuis très longtemps, entrer dans le monde de la recherche, des laboratoires et de la Biologie. Grâce à ces années de thèse au sein de l'équipe de Valérie Castellani, ce projet a pu aboutir à travers un sujet passionnant et la bonne humeur qui règne au sein de l'équipe.

Je remercie tout particulièrement Valérie pour cette bonne humeur quotidienne, sa motivation et son côté humain qui font d'elle une directrice de thèse formidable pouvant supporter toutes mes réflexions naïves et pas forcément réfléchies. Merci pour tous tes conseils, ta rigueur, ta confiance et tes encouragements qui m'ont été indispensables tout au long de ces années et le seront dans le futur. Je te remercie également Frédéric pour tout ce que tu m'as appris, pour ta patience à répondre à toutes mes questions, ta rigueur et ta tolérance par rapport à toutes mes idées plus ou moins farfelues. Tes conseils me seront très précieux pour les années à venir.

Je te remercie Julien pour toutes les discussions que nous avons eues ainsi que tes nombreux conseils. Muriel et Karine merci pour votre aide précieuse et votre bonne humeur inépuisable. Merci encore à tous les autres, Arnaud, Camille, Céline, Ed, Florie (ma coloc et stagiaire :D, prends soin du bébé), Homaira, Isa, Julie, Karinette, Leïla, Yohan s'en oublier Brigitte, Laurette et Jean Michel. Votre joie de vivre, votre bonne humeur et toutes ces soirées ont fait de ces années de thèse des années inoubliables. J'espère retrouver une telle ambiance dans les prochains laboratoires, vous allez me manquer. Un grand merci à toute l'équipe de m'avoir, chacun à votre manière, transmis votre amour et passion pour la recherche et la Biologie (petite pensée pour Ed... :D).

Je remercie également tout le CGφMC pour l'aide de chacun et les discussions entre gel de BET et machine à café...



Merci à Fabienne, Flavio, Mehdi et Yacine qui m'ont encadrée pendant mes stages de M1 et M2 et m'ont initiée à la recherche, cela a été un réel plaisir de travailler avec vous. A bientôt j'espère !!

Merci à tous mes amis Lillois, Lyonnais, Marseillais et Varois, pour tous ces fantastiques moments partagés à vos côtés.

Un grand merci à toute ma famille pour leur soutien, leur confiance et leurs encouragements et ce n'est pas sans l'aide et la présence de chacun que j'aurais réussi à réaliser mon rêve, je vous adore. Je remercie tout particulièrement mes parents et ma grande sœur Claire, j'ai une chance formidable de vous avoir.

Enfin je te remercie Fabien, ma moitié, merci pour tout ton soutien et toutes ses années passées ensemble, il en reste tant à partager. Tu es passé avant moi dans le clan des chercheurs et ce n'est pas sans admiration que je m'y suis lancée, je pense que sans toi rien n'aurait été possible. Merci pour ce magnifique cadeau de Noël que tu m'as fait l'année dernière. Ce petit Adel qui grandit au sein de notre foyer et qui a permis d'illuminer cette dernière année de thèse. Avec vous j'ai hâte de commencer notre nouvelle vie sur le nouveau continent.

Encore un grand merci à tous et pour tout ...



<b>RESUME FRANÇAIS</b> .....	<b>9</b>
<b>ENGLISH SUMMARY</b> .....	<b>12</b>
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION</b> .....	<b>15</b>
INTRODUCTION GENERALE .....	16
1. <i>Les informations de position spatiale et la mise en place du plan d'organisation embryonnaire</i>	16
2. <i>Comment est matérialisée l'information de position au niveau moléculaire ?</i> .....	17
a) Des molécules spécifiquement localisées définissent un territoire .....	17
b) L'information de position, codée par la concentration du facteur. ....	18
i. Les gradients de concentration, principe et mise en place .....	18
ii. L'utilisation de l'information de position donnée par les gradients .....	19
3. <i>Conclusion</i> .....	21
I. L'ORIENTATION DES DIVISIONS CELLULAIRES DANS LE DÉVELOPPEMENT DES METAZOAIRES .....	22
1. <i>Le fuseau mitotique: une structure complexe contrôlant la ségrégation des chromosomes et l'orientation des divisions cellulaires</i> .....	22
a. Le fuseau mitotique : un échafaudage de microtubules .....	23
i. Les microtubules armatures du fuseau mitotique .....	23
ii. Les centrosomes, les Centres Organisateurs des Microtubules et pôle du fuseau mitotique .....	24
iii. Les trois types de fibres de microtubules .....	24
b. Mise en place et dynamique du fuseau mitotique .....	25
c. Les points de contrôle du fuseau mitotique .....	27
d. La position du fuseau mitotique influe sur plan de séparation des cellules filles .....	28
2. <i>Implication de l'orientation du fuseau mitotique pendant le développement</i> .....	30
a. L'orientation du fuseau mitotique contrôle la forme des tissus .....	30
b. L'orientation du fuseau mitotique participe à la spécification de nombreux types cellulaires .....	33
3. <i>Les mécanismes impliqués dans l'orientation du fuseau mitotique</i> .....	36
a. Les mécanismes intrinsèques qui participent à l'orientation du fuseau mitotique .....	36
i. Le rôle des moteurs moléculaires dans la mise en place du fuseau mitotique .....	36
ii. L'ancrage des microtubules au cortex cellulaire .....	37
iii. La polarité cellulaire intrinsèque et l'orientation du fuseau mitotique .....	40
iv. L'implication de la voie Rho-GTPase dans l'orientation du fuseau mitotique .....	42
b. Les mécanismes extrinsèques qui participent à la régulation du fuseau mitotique. ....	44
i. L'environnement extracellulaire et la forme de la cellule agissent sur l'orientation du fuseau mitotique .....	45
ii. Les voies de la polarité planaire : lien entre les signaux extrinsèques et intrinsèques .....	46
4. <i>Conclusion</i> .....	48
II. LE DEVELOPPEMENT DU TUBE NEURAL ET LA NEUROGENESE PRIMAIRE DE LA MOELLE EPINIÈRE CHEZ LES VERTEBRES .....	50
1. <i>Mise en place du tube neural et régionalisation de la moelle épinière chez les vertébrés</i> .....	50
a. Induction neurale et Neurulation .....	50





b.	Régionalisation de la moelle épinière .....	51
i.	La régionalisation antéro-postérieure.....	52
ii.	La régionalisation dorso-ventrale .....	52
2.	<i>La neurogénèse primaire de la moelle épinière</i> .....	53
a.	Dynamique des progéniteurs neuraux dans la Zone Ventriculaire de la moelle épinière .....	53
b.	Les principales voies de signalisation et mécanisme qui génèrent des neurones.....	54
i.	Les facteurs proneuraux, la voie Delta/Notch et le destin neuronal .....	54
ii.	L'hypothèse de l'héritage de déterminants cytoplasmiques du destin .....	57
iii.	L'orientation du fuseau mitotique a-t-elle un rôle dans la génération des neurones chez les vertébrés ? .....	59
III.	LES SEMAPHORINES : SIGNAUX DE POSITION, CANDIDATS POTENTIELS DANS LA REGULATION EXTRINSEQUE DE L'ORIENTATION DU FUSEAU MITOTIQUE.....	64
1.	<i>La famille des Sémaforines, présentation</i> .....	64
2.	<i>Les Sémaforines de la classe III (Sema3)</i> .....	65
a.	Des facteurs chimiotropiques .....	65
b.	Les complexes récepteurs des Sema3.....	67
c.	La signalisation des Semaphorines de la classe 3 et contrôle du cytosquelette .....	69
i.	Contrôle de la dynamique des microtubules par la signalisation Sema3.....	69
ii.	Contrôle de la dynamique de l'actine par la signalisation Sema3 .....	70
<b>CHAPITRE II : RESULTATS .....</b>		<b>72</b>
I.	SEMA3B, UN SIGNAL EXTRACELLULAIRE CONTROLANT L'ORIENTATION DE LA DIVISION DES PROGENITEURS NEURAUX AU COURS DE LA NEUROGENESE PRECOCE DE LA MOELLE EPINIERE .....	73
	<i>Materials and Methods</i> .....	76
II.	ORIENTATION DES DIVISIONS DES PROGENITEURS NEURAUX DANS L'AXE DORSO-VENTRAL ET ANTEROPOSTERIEUR.....	81
III.	CONSEQUENCES DE L'INVALIDATION DE LA SEMAPHORINE 3B A DES STADES PLUS TARDIFS DE LA NEUROGENESE .....	84
1.	<i>Prolifération des progéniteurs spinaux et morphogénèse de la moelle épinière</i> .....	84
2.	<i>Morphologie de la zone ventriculaire</i> .....	86
a.	Taille de la zone ventriculaire.....	86
b.	Distribution des cellules cyclantes et post-mitotiques.....	87
3.	<i>Devenir des progéniteurs neuraux entre E10.5 et E12.5</i> .....	88
<b>CHAPITRE III : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>		<b>91</b>
1.	<i>Mécanismes d'action de la protéine Sema3B sur l'orientation des progéniteurs neuraux</i> .....	93
a.	Sema3B pourrait agir sur les progéniteurs aux stades en prophase/métaphase pour orienter leurs divisions .....	93
b.	Sema3B, un signal polarisé dans l'axe apico-basal pour les progéniteurs en mitose.....	94
c.	Sema3B contrôle l'orientation d'une sous-population de progéniteurs neuraux .....	96
d.	Sites de fixation de Sema3B, récepteurs et voie de signalisation impliqués .....	97



2. Rôle de Sema3B dans l'orientation des divisions par rapport aux dorso-ventral et antéro-postérieur.....	101
3. Implication de Sema3B dans la balance prolifération/neurogenèse et lien avec le contrôle de l'orientation des divisions .....	104
4. Conservation des rôles entre les différentes Sémaphorines, molécules de guidage et organes	108
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>111</b>



# RESUME FRANÇAIS



L'orientation des divisions cellulaires est un processus majeur impliqué dans la morphogénèse des tissus, le renouvellement et le contrôle du destin cellulaire. Au cours du développement du système nerveux chez les vertébrés, la croissance du tube neural et la génération des cellules neuronales et gliales résultent de la prolifération de progéniteurs neuraux organisés le long d'un neuroépithélium fermé autour d'un canal central. L'orientation du fuseau des progéniteurs en mitose par rapport au plan apical est cruciale pour la conservation de l'intégrité du neuroépithélium. Elle peut aussi influencer le destin des cellules filles. Jusqu'à présent, les études se sont principalement concentrées sur les mécanismes intracellulaires contrôlant l'orientation du fuseau mitotique, en revanche, l'existence de signaux extracellulaires y contribuant est mal définie à l'heure actuelle. Durant le développement de la moelle épinière, le canal du tube neural est une source de signaux extracellulaires majeurs comme les morphogènes. Pour la plupart des progéniteurs neuraux, la mitose a lieu au niveau apical à proximité du canal central. Nous avons donc émis l'hypothèse que le canal pourrait aussi délivrer des signaux extracellulaires régulant l'orientation des divisions des progéniteurs neuraux. Mes travaux de thèse révèlent que de tels signaux existent. Plus particulièrement je montre que la Sémaphorine 3B, un facteur initialement connu pour son rôle chimiotropique, joue un rôle majeur dans l'orientation des divisions des progéniteurs spinaux.

Chez des embryons de souris E10.5 maintenus en incubation à court terme après ouverture de leur tube neural et dilution du liquide céphalorachidien, nous observons une forte augmentation du pourcentage de divisions obliques comparées aux embryons non ouverts. L'analyse d'une lignée de souris dans laquelle le canal central est scindé en deux sous-canaux indépendants, créant ainsi une obstruction du flux entre les parties dorsales et ventrales du canal révèle aussi une altération de l'orientation des divisions des progéniteurs neuraux. Des signaux provenant du canal sont donc nécessaires à l'orientation planaire de la division d'une population de progéniteurs spinaux. Par hybridation *in situ* et immuno-marquage, nous avons mis en évidence l'expression d'ARN et de protéines Sema3B dans des cellules de la plaque du plancher aux stades E10.5 et E11.5. Ce résultat suggèrerait que cette Sema3 pouvait être sécrétée dans le canal de l'épendyme. L'inactivation du gène Sema3B a conduit à une diminution du pourcentage des divisions planaires à E10.5





sans changement de leur nombre ou de leur polarité. De plus, une exposition à court terme des tubes neuraux ouverts à de la Sema3B exogène, a rétabli des divisions planaires dans une large proportion de progéniteurs neuraux. Les défauts d'orientation des mutants Sema3B sont corrélés à une altération secondaire de la prolifération, de la croissance de la moelle et de la neurogenèse. Ces résultats révèlent ainsi qu'au-delà de son rôle de sécréteur de morphogène, la plaque du plancher fournit aussi un signal extracellulaire qui contrôle l'orientation de division de progéniteurs neuraux. Ce travail suggère aussi que la signalisation Sémaphorine, connue comme instructive dans le guidage des cellules et axones migrants, puisse être interprétée par des cellules neuroépithéliales comme des repères spatiaux extrinsèques permettant l'orientation de leur fuseau mitotique.



# ENGLISH SUMMARY



In pluricellular organisms, the orientation of cell division has a major impact on tissue morphogenesis architecture and renewal, as well as on cell fate choices. During the development of the central nervous system in vertebrates, the growth of the neural tube and the generation of neuronal cells and glial cells result from the proliferation of neural progenitors organized in a neuroepithelium closed around a central canal. The orientation of progenitor mitotic spindle with respect to the apical plan is important for the conservation of the integrity of the neuroepithelium and influences the fate of daughter cells. Previous studies mainly focused on intracellular mechanisms controlling the mitotic spindle orientation, but whether extracellular signaling contributes to this process remains unknown. In the developing spinal cord, the lumen is a source of major extracellular signals like morphogens. For most neural progenitors, the mitosis takes place at the apical pole in tight vicinity of the central lumen. We hypothesized that canal-derived extracellular signals could regulate the orientation of neural progenitor divisions.

My PhD work aimed at testing this hypothesis and identifying such factors. We show that dorsally open neural tubes from E10.5 mice, maintained in short term culture display a strong increase in the percentage of oblique divisions compared to un-open ones. The genetic disruption of the lumen fluid diffusion between the ventral and dorsal parts of the lumen leads to similar defects. Lumen-derived signals are thus required for neural progenitors to achieve planar divisions in the mouse spinal neuroepithelium at the onset of neurogenesis. By *in situ* hybridization, immunostaining and a knock-in mouse line, we detected *Sema3B* mRNA and proteins in floor plate cells at E10.5 and E11.5, which suggests that it could be secreted in the lumen of the spinal cord. The invalidation of *Sema3B* results in a decrease in the percentage of planar divisions in E10.5 spinal progenitors without alteration of progenitor number or polarity. Furthermore, a short term exposure of open neural tubes to exogenous *Sema3B* restores planar divisions in a large population of spinal progenitors. We observed that *Sema3B* knock out subsequently altered proliferation and neurogenesis steps. These results thus reveal that beyond its role as morphogen-releasing organizer, the floor plate also provides an extracellular signal which controls the orientation of neural progenitor division. This work also suggests that *Sema* signaling known as an instructive chemotropic cue in



the guidance of migrating cells and axons also serves for neuroepithelial cells as an extrinsic cue to control the orientation of their division





# CHAPITRE I : INTRODUCTION



## INTRODUCTION GENERALE

L'apparition des organismes pluricellulaires au cours de l'évolution a bouleversé l'organisation du vivant. En effet, les cellules ne se retrouvent plus indépendantes et libres de leurs mouvements et fonctions, elles sont incluses dans un tissu, un organe dans lequel leur position et leur polarité au sein de ce tissu est primordiale pour assurer le bon fonctionnement de l'organisme auquel elles appartiennent. Par cet effet, les organismes pluricellulaires possèdent un plan d'organisation précis, qui leur est indispensable pour survivre. La mise en place de ce plan d'organisation est très contrôlée et fait intervenir de nombreux processus développementaux comme l'acquisition d'informations spatiales par les cellules, la migration ou la division cellulaire. En effet, la bonne forme et position des organes et tissus à l'intérieur de l'organisme permettent une réalisation optimale des fonctions vitales comme la respiration, la circulation sanguine, la digestion, la locomotion, la reproduction et le comportement...

### **1. Les informations de position spatiale et la mise en place du plan d'organisation embryonnaire**

Ce plan d'organisation se met en place lors du développement de l'organisme pendant lequel est mis en œuvre un programme génétique développemental complexe et stéréotypé. Très tôt au cours du développement embryonnaire, des mécanismes moléculaires et cellulaires entrent en jeu pour définir les axes de polarité majeurs (antéro-postérieur, dorso-ventral, gauche-droite et proximo-distal) autour desquel le plan s'organise.

La position des cellules par rapport à ces axes de polarité puis par rapport aux polarités du tissu ou de l'organe est un paramètre majeur du développement. Elle influe en effet sur le type de programme développemental que les cellules vont subir. De sa position spatiale peut ainsi dépendre l'état de prolifération de cette cellule, la spécification d'un type cellulaire particulier, l'engagement vers un programme de mort



cellulaire, le passage d'un état épithélial à mésenchymateux, une différenciation morphologique et fonctionnelle particulière.

La notion de position spatiale constitue aussi un élément crucial pour les processus impliquant des mouvements cellulaires dans l'organisme en développement. Au cours de la gastrulation par exemple, des feuilletts entiers de tissus se déplacent les uns par rapport aux autres. Parfois, ce sont des cellules isolées qui migrent au sein de l'embryon comme les cellules de la crête neurale qui migrent sur de longues distances avant de se différencier. Un autre exemple relevant de la différenciation et de la migration est la mise en place des projections neuronales, dendrites et axones, reliant le corps cellulaire du neurone à des cibles parfois très éloignées. Dans ces situations, la cellule ou seulement une partie (le cône de croissance de l'axone) sont guidées selon une trajectoire stéréotypée jusqu'à leur territoire cible. Pour cela, les cellules sont capables de percevoir des informations sur leur position spatiale et d'adapter leur comportement en fonction de ces informations. Dans le cas des projections axonales, la notion de position est exploitée à un niveau très complexe puisqu'elle permet la mise en place d'un nombre considérable de trajectoires différentes.

## **2. Comment est matérialisée l'information de position au niveau moléculaire ?**

### **a) Des molécules spécifiquement localisées définissent un territoire**

L'information de position est souvent portée par des protéines, ainsi que par des molécules biosynthétisées (comme l'acide rétinoïque), présente dans l'environnement de la cellule, sécrétées ou à la membrane des cellules environnantes. L'identité du signal constitue une information de position lorsque ce signal est lui-même localisé spécifiquement dans un territoire. L'existence de multiples signaux agissant parfois de manière combinée permet ainsi de générer une mosaïque stéréotypée de territoires différents. Si l'on reprend l'exemple des cellules de la crête neurale en migration, des protéines de la matrice extracellulaire comme les laminines, autorisent la migration de ces cellules le long de corridors où elles sont



présentes, alors que les chondroïtine sulfate et les protéoglycans rendent les territoires adjacents non perméables à leur migration (Perris and Johansson, 1990; Perris et al., 1989) et pour revue voir ((Henderson and Copp, 1997)). Ainsi par leurs effets, de multiples molécules contribueraient au positionnement de cellules dans l'organisme, à la différenciation morphologique et à l'acquisition de leur propre polarité.

**b) L'information de position, codée par la concentration du facteur.**

*i. Les gradients de concentration, principe et mise en place*

Une distribution gradée d'un seul facteur dans l'espace, c'est-à-dire en gradient, permet de définir plusieurs positions. Cela économise le nombre de molécules mises en jeu pendant le développement et permet de définir des territoires très précis. En effet, les cellules sont capables de sentir une faible différence de concentration d'un pôle à l'autre de leur corps cellulaire. De plus, les cellules peuvent réagir à des combinaisons de gradients ce qui permet une multitude d'informations encodées par un petit nombre de molécules.

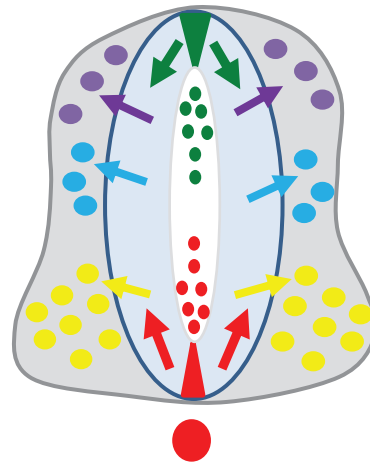
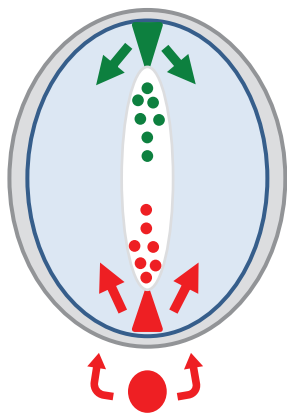
La mise en place des gradients de concentration peut faire intervenir plusieurs mécanismes. Le cas le plus simple est celui des facteurs diffusibles : la molécule est sécrétée par un tissu ou des cellules à un endroit donné de l'embryon. Elle est donc concentrée au niveau de sa source puis diluée au fur et à mesure de sa diffusion (Dekanty and Milan, 2011). Les gradients peuvent aussi être formés par des molécules exprimées à la membrane des cellules dont la quantité synthétisée est variable d'une cellule à l'autre, comme par exemple, les Ephrines (pour revue voir (Flanagan, 2006) et (Feldheim and O'Leary, 2010)).



**BMP**



**Shh**



**Interneurones dorsaux**

**Interneurones**

**Motoneurones**



**Développement embryonnaire**

**Figure 1 : Interprétation des gradients comme information de position : l'exemple de l'identification dorso-ventrale de la moelle épinière des amniotes.** Les gradients d'expression des morphogènes Sonic hedgehog (Shh) et BMP sont représentés : en rouge Shh sécrété par la notochorde et la plaque du plancher et en vert BMP sécrété par la plaque du toit. Leur gradient d'expression active différents facteurs de transcription dans les progéniteurs neuraux de la moelle épinière ce qui leur confère une identité spécifique en fonction de leur position au sein du tube neural. D'après l'ouvrage : « le développement d'un mammifère : la souris » Thierry DARRIBÈRE, 2003.

## *ii. L'utilisation de l'information de position donnée par les gradients*

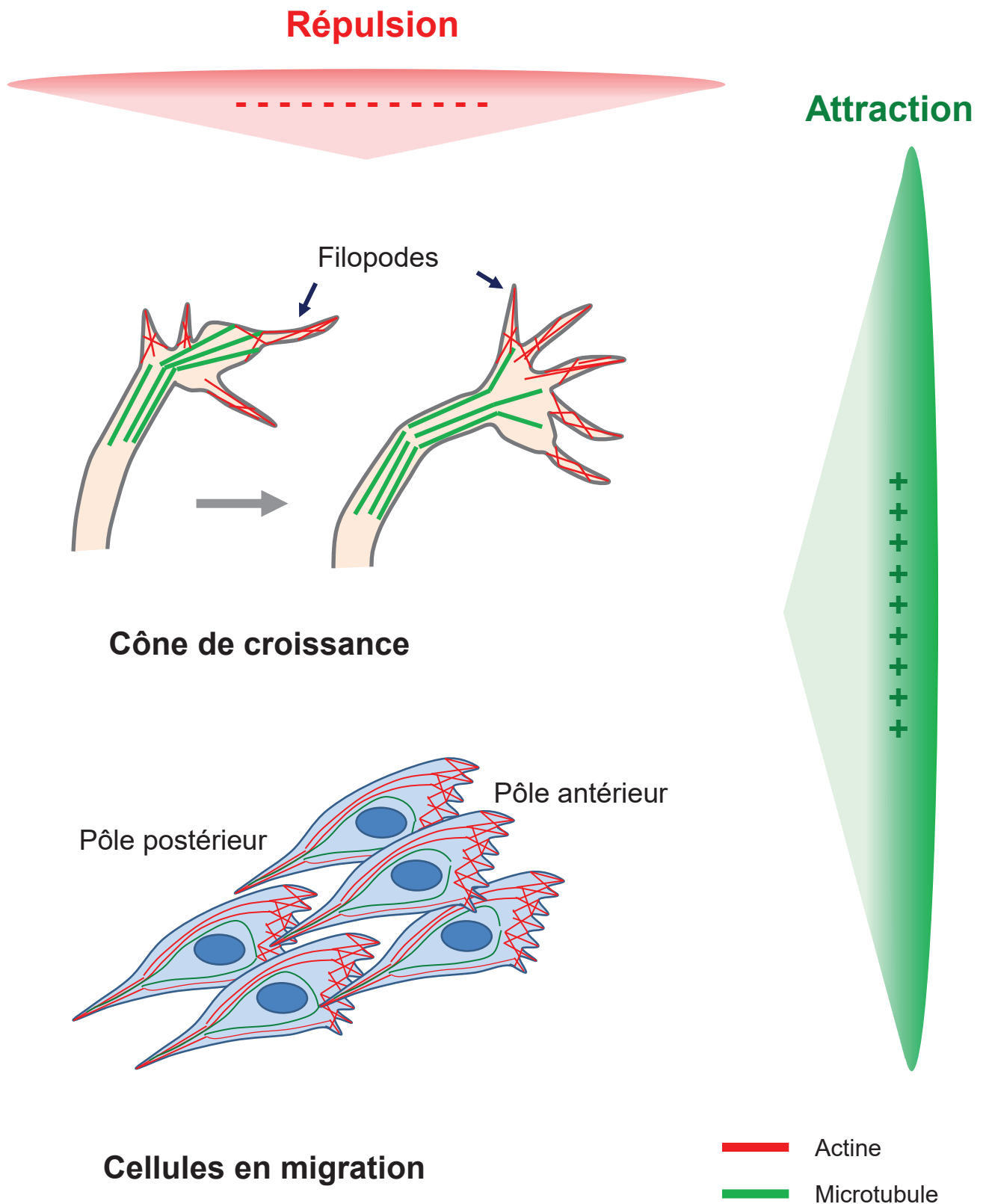
Les gradients moléculaires contrôlent deux grands processus développementaux : la spécification des cellules au sein d'un tissu et le guidage des cellules en migration et des axones en croissance.

### - Spécification des cellules dans un tissu

Les cellules, possédant des positions différentes, sont exposées à des concentrations de gradients également différentes. Ces différences sont à la base de l'acquisition d'identités distinctes. C'est le cas par exemple des progéniteurs neuraux du tube neural chez les amniotes : à partir d'un tube creux constitué d'un épithélium pseudostratifié, il est nécessaire de générer un système complexe et très élaboré qui est le système nerveux central avec des neurones, des cellules gliales... Le développement du tube neural commence par l'acquisition d'une identité antéro-postérieure et dorso-ventrale. En ce qui concerne l'identité dorso-ventrale, les cellules indifférenciées du tube neural reçoivent des signaux provenant de deux sources : la plaque du toit au côté dorsal qui sécrète une protéine BMP et la notochorde ainsi que la plaque du planché, côté ventral, sécrétant la protéine Sonic Hedgehog (Shh). Ces morphogènes sont sécrétés dans le canal du tube neural ce qui aboutit à la formation d'un gradient BMP/Shh qui va réguler la mise en place et la spécification des différents types de neurones dans la moelle épinière. Les progéniteurs neuraux situés en partie ventrale reçoivent une forte concentration de la protéine Shh qui va activer les voies de différenciation pour former des motoneurones tandis qu'au côté dorsal, une forte concentration de BMP favorise la formation des interneurones dorsaux. Entre les deux, de nombreux types de cellules neuronales sont générées par activation de différentes voies de différenciation en fonction de leur position dans les gradients de concentrations de BMP/Shh (**Figure 1**) (pour revue (Dessaud et al., 2008)).

### - Gradient et migration orientée

Les gradients de concentration sont aussi utilisés pour définir une trajectoire aux cellules en migration et axones en croissance. Ces gradients génèrent des comportements d'attraction et de répulsion. Pour effectuer leur trajectoire, les cellules et axones doivent tout d'abord se polariser. Pour cela, ils sont capables de



**Figure 2 : Interprétation des gradients comme informations de guidage pour les cellules en migration et les axones en croissance.** Des protéines sécrétées en gradients sont perçues par les cellules et axones en croissance. Ils provoquent le remodelage de leur cytosquelette (filaments d'actine et/ou microtubules).

sentir une faible différence de concentration le long de leur corps cellulaire ou du cône de croissance. L'information est alors convertie en un signal interne amplifié et gradué qui permet la réorganisation du cytosquelette et ainsi la polarisation de la structure. La cellule possède alors un avant qui s'allonge et un arrière qui se rétracte. Le cône de croissance stabilise des prolongements (filopode/lamellipode) sur une partie et en rétracte d'autres sur une autre partie ce qui permet une croissance orientée. Plusieurs familles de molécules de guidages sont connues comme les Ephrines, les Netrines, les Sémaphorines ou les Slit (pour revue voir (Berzat and Hall, 2010)). Ces processus de guidages sont très conservés et ne sont pas utilisés que dans l'organisme en développement, nous les retrouvons aussi chez l'adulte. Par exemple dans le système immunitaire, les leucocytes atteignent leur cible grâce à des gradients de Cytokines sécrétés par les cellules de l'immunité situées sur le site de l'infection (pour revue voir (von Philipsborn and Bastmeyer, 2007)) et (**Figure 2**).

Ces nombreux remodelages de feuillettes, ces migrations cellulaires ainsi que ces modifications et différenciations cellulaires durant le développement vont permettre la formation des différents organes et la fabrication d'un organisme fonctionnel. L'organogénèse est un processus extrêmement régulé dans l'espace ainsi que dans le temps. En effet, la compétence d'une cellule à une signalisation donnée est limitée dans le temps, l'espace et de manière quantitative. Cette compétence se traduit par le fait que la cellule possède des récepteurs et des effecteurs spécifiques d'une signalisation donnée à une certaine concentration ce qui va lui permettre d'y répondre. Ainsi, en fonction de sa position, une ébauche d'organe reçoit des informations de positions stéréotypées (limitation spatiale) mais sera compétente à cette signalisation pendant une période précise du développement (limitation temporelle) (pour revue voir (Kiecker and Lumsden, 2012) exemple de compétences cellulaires dans le développement du système nerveux et (Rapaport et al., 2001)).



### **3. Conclusion**

De multiples familles de protéines et de molécules biosynthétiques produites dans l'embryon servent de signaux environnementaux délivrant des informations de position ou de direction spatiale.

La problématique générale de la thèse repose sur un aspect développemental pour lequel le rôle d'informations de position est peu étudié, il s'agit de l'orientation des divisions cellulaires. De nombreuses divisions cellulaires ont lieu selon une orientation particulière et la cellule en division a pourtant besoin d'informations pour s'orienter dans l'espace. L'orientation de la division a en effet un rôle dans la disposition des cellules filles par rapport au tissu environnant et sur le partage des composants cellulaires cytoplasmiques entre les deux cellules filles. Nous avons émis l'hypothèse que des facteurs environnementaux pourraient permettre à une cellule en mitose de se repérer dans l'espace du tissu auquel elle appartient, relativement aux tissus voisins et de disposer son plan de division de manière appropriée par rapport aux différents axes.

Durant mes trois années de thèse, je me suis intéressée aux divisions cellulaires des progéniteurs neuraux de la moelle épinière pendant la période de neurogenèse embryonnaire. Nous avons tout d'abord testé l'hypothèse d'une contribution de signalisation extracellulaire dans ce processus. Puis nous avons recherché des signaux candidats. La Sémaphorine 3B, connue pour son rôle dans le guidage axonal, étant exprimée dans le tube neural pendant la neurogenèse, nous avons émis l'hypothèse qu'elle pouvait contrôler la division des progéniteurs pendant cette période. Nous montrons dans ces travaux, un rôle original de Sema3B dans ce contexte.



## I. L'ORIENTATION DES DIVISIONS CELLULAIRES DANS LE DÉVELOPPEMENT DES METAZOAIRES

Au cours du développement, il est apparu dans de nombreux contextes que l'orientation des divisions cellulaires n'est pas aléatoire, au contraire, certaines divisions privilégient un angle de division particulier par rapport aux axes de polarité de l'embryon ou du tissu environnant. Cette orientation varie en fonction des cellules, de leur propre position, de leur polarité intrinsèque, de leur devenir et de la période concernée durant le développement. La position des cellules filles à l'issue de la mitose et aussi leur taille relative est préfigurée par la position d'une structure essentielle de la mitose : le fuseau mitotique, au cours d'une phase particulière de la mitose : l'anaphase. Dans un premier temps, nous décrirons la structure de ce fuseau, sa dynamique et le lien qui existe entre son positionnement dans la cellule et celui des cellules filles. A travers plusieurs exemples, nous montrerons en quoi l'orientation de la division cellulaire est un paramètre crucial du développement. Ces situations révèlent l'existence de mécanismes robustes de contrôle de l'orientation du fuseau mitotique. Une partie sera consacrée à une présentation de ces mécanismes. Jusqu'aujourd'hui, une attention particulière a été portée sur les mécanismes intrinsèques qui contrôlent l'orientation des divisions. Toutefois, nous verrons que plusieurs éléments soutiennent que des facteurs extrinsèques jouent aussi un rôle crucial et ont fondé notre hypothèse de travail.

### 1. Le fuseau mitotique: une structure complexe contrôlant la ségrégation des chromosomes et l'orientation des divisions cellulaires

Le fuseau mitotique est une structure complexe qui relie les chromosomes (porteurs de l'information génétique et composés de deux chromatides sœurs) et le cortex de la cellule lors de la phase de mitose. Un de ces rôles principaux est d'aligner les chromosomes au niveau de l'équateur de la cellule pendant la métaphase, puis d'assurer la ségrégation équitable des chromatines sœur entre les deux cellules filles pendant l'anaphase. Il détermine aussi l'orientation de l'axe de





division des cellules, la position des pôles au niveau desquels les chromatides sont tractées, La position du fuseau mitotique dicte aussi la position du plan de constriction et de séparation des deux cellules filles à la cytokinèse (pour revue voir (Eggert et al., 2006) et (Strome, 1993)).

### **a. Le fuseau mitotique : un échafaudage de microtubules**

Le fuseau mitotique est une structure très dynamique constituée de fibres de microtubules et de ses Centres Organiseurs (MTOC) : les centrosomes. C'est grâce à des partenaires protéiques tels que les moteurs de dynéine/dynactine ou kinésine qu'il établit des interactions complexes avec le cortex de la cellule et les chromosomes (**Figure 3**). Nous allons détailler dans cette partie ces différents constituants.

#### *i. Les microtubules armatures du fuseau mitotique*

Les microtubules sont des constituants du cytosquelette. Au sein de la cellule, ils effectuent diverses fonctions biologiques et permettent le transport cytoplasmique de vésicules et de molécules, le positionnement des organelles et coordonnent au cours de la mitose la ségrégation des chromosomes, le positionnement du fuseau mitotique et la cytokinèse. Pour effectuer ces fonctions diverses, les microtubules s'organisent en structures distinctes ; par exemple dans le fuseau mitotique : les microtubules kinétochoriens, interpolaire et astraux.

Les microtubules sont des assemblages de polymères d' $\alpha$  et  $\beta$  tubuline. L'orientation de ces hétérodimères leur confère une polarité intrinsèque. Ceci définit une terminaison positive (pôle +), où la  $\beta$ -tubuline est exposée et une terminaison négative (pôle -), où l' $\alpha$ -tubuline est exposée. Un microtubule est très dynamique, il se polymérise et se dépolymérise en permanence par ajout ou perte de dimères aux extrémités. Pour cela, les deux extrémités ont des propriétés de dynamique distincte : l'extrémité positive se polymérise plus vite que la négative et l'extrémité négative se dépolymérise plus vite que la positive. En règle générale, les



microtubules se polymérisent via leur extrémité positive (l'extrémité négative se situe donc au niveau des MTOC qui les synthétisent). Dans leur état dit d'équilibre, les taux de polymérisation correspondent aux taux de dépolymérisation (pour revue voir (Desai and Mitchison, 1997)).

Pendant la métaphase, les microtubules se réorganisent pour former une structure bipolaire : le fuseau mitotique. Pendant la durée de la mitose, ils vont subir des séries de polymérisation/dépolymérisation pour se réorganiser et permettre la ségrégation des chromosomes (pour revue voir (Meunier and Vernos, 2012)).

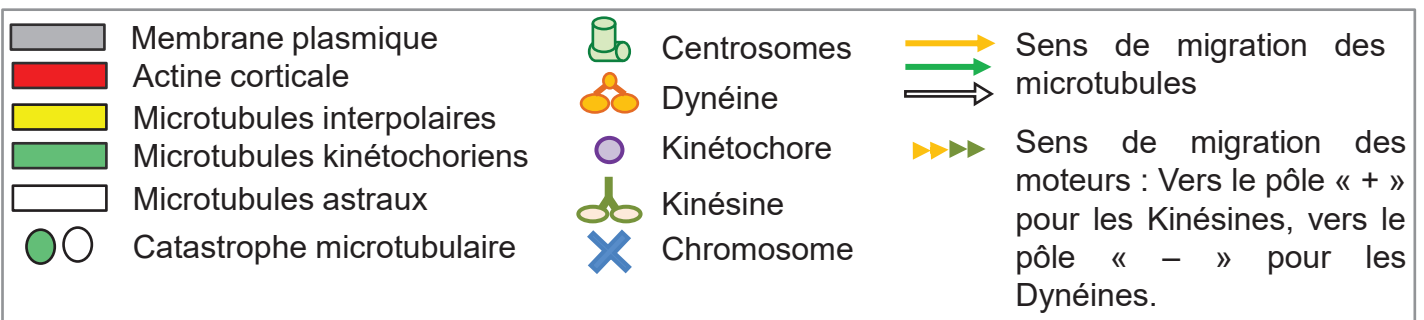
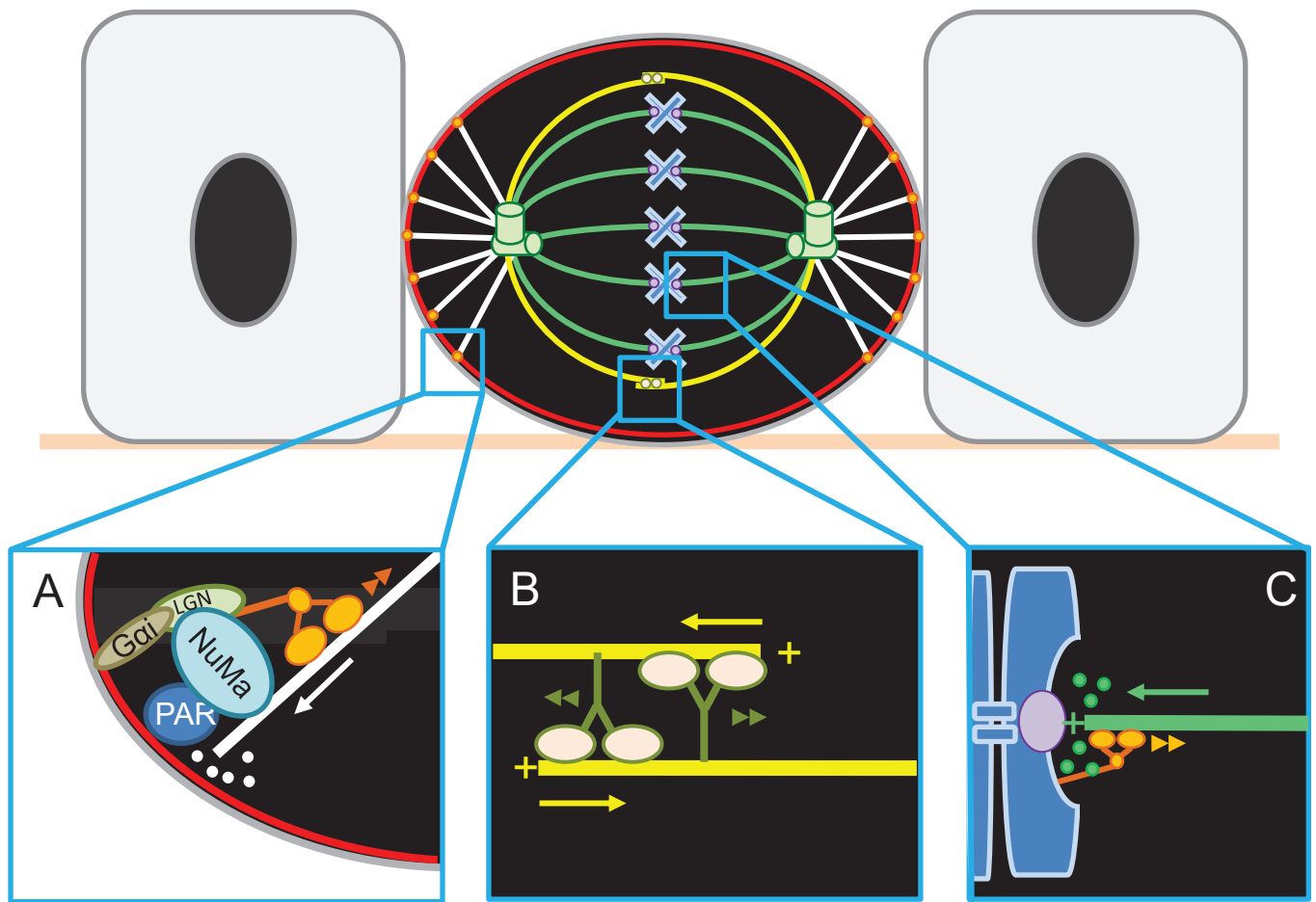
*ii. Les centrosomes, les Centres Organiseurs des Microtubules et pôle du fuseau mitotique*

Les centrosomes ont pour rôle de synthétiser les microtubules. Ils sont constitués d'une paire de structures cylindriques : les centrioles. Les centrioles sont composés de neuf triplets de microtubules entourés par le matériel péricentriolaire (PCM) qui permet la nucléation des microtubules grâce la présence en surface d'anneaux de tubuline  $\gamma$ . L'ensemble est appelé Centre Organisateur de Microtubules (MTOC). Pendant la mitose, nous pouvons observer la présence de deux centrosomes qui forment les pôles du fuseau mitotique (pour revue voir (Gogendeau and Basto, 2010) et (Urbani and Stearns, 1999)).

*iii. Les trois types de fibres de microtubules*

Le fuseau mitotique est constitué de trois types de fibres microtubulaires.

1) Les fibres kinétochoriennes de microtubules se polymérisent à partir des deux MTOC et leur pôle positif va interagir avec les kinétochores situés de chaque côté des centromères des chromosomes. Ils permettent d'attacher les chromosomes aux deux pôles du fuseau mitotique (pour revue voir (Takeuchi and Fukagawa, 2012)) (**Figure 3**).



**Figure 3 : Structure du fuseau mitotique pendant la Métaphase.** **A)** Les microtubules astraux interagissent avec le cortex de la cellule via des protéines comme NumA, Gai, LGN. Ils ont pour rôle d'orienter le fuseau mitotique et d'éloigner les centrosomes de l'équateur de la cellule. **B)** Les interpolaire relient les deux centres organisateur, les centrosomes, entre eux et grâce aux moteurs de kinésines, qui se déplacent vers le pôle positif (+) ils permettent ainsi l'éloignement des centrosomes. **C)** Les microtubules kinétochoriens interagissent avec les centromères des chromosomes. Ils les alignent au niveau de l'équateur de la cellule puis, en dépolymérisant, ils se raccourcissent et permettent la ségrégation des chromatines sœurs entre les deux cellules filles.

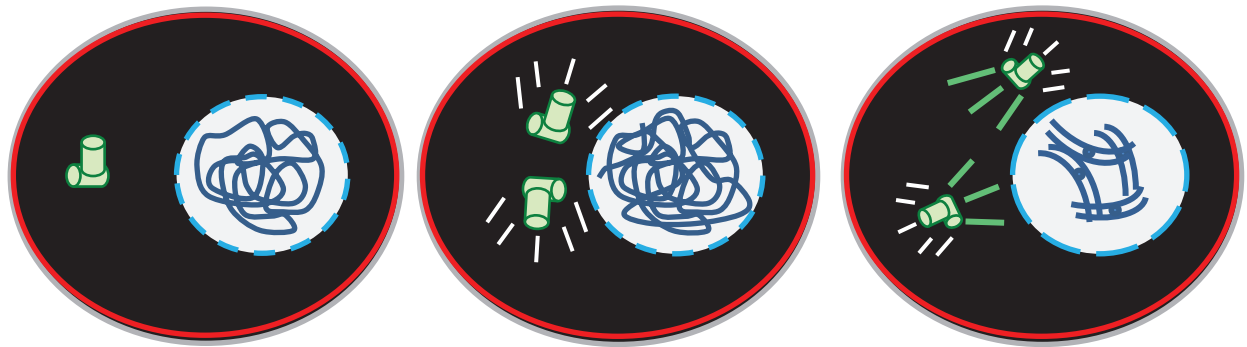
2) Les microtubules interpolaire, le type le plus abondant de microtubules, se forment au niveau des centrosomes et s'étendent vers le centre du fuseau mitotique (l'équateur de la cellule). A ce niveau, les fibres des microtubules opposées se rencontrent et forment un réseau antiparallèle. Ils ont plusieurs fonctions comme celle d'établir et maintenir la polarité du fuseau (pour revue voir (Winey and Bloom, 2012)) (**Figure 3**).

3) Les microtubules astraux partent des centrosomes en direction du cortex à chaque pôle de la cellule. Ils ancrent le fuseau mitotique au cortex de la cellule grâce à des repères corticaux reconnus par les moteurs de Dynéine-Dynactine (comme NuMA...). Le positionnement et l'orientation du fuseau mitotique est donc très liés à la localisation de ces repères corticaux,. Les mécanismes du positionnement et de l'orientation du fuseau mitotique seront traités plus tard dans cette thèse, en I.3.a. (Du and Macara, 2004; Merdes et al., 1996) (**Figure 3**).

#### **b. Mise en place et dynamique du fuseau mitotique**

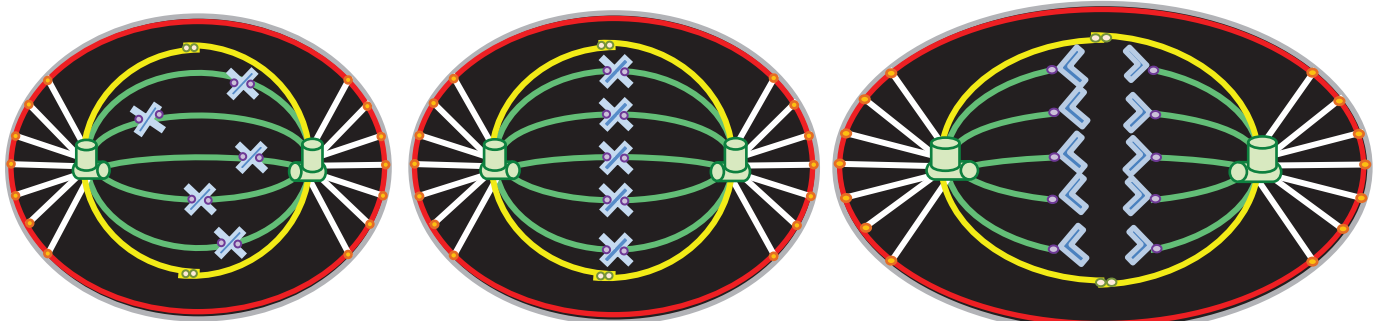
Le fuseau mitotique se met en place au début de la mitose (prophase) et sa structure et dynamique sont coordonnées aux différentes phases qui suivent. Le centrosome est dupliqué avant la mitose : des procentrioles ou centrioles fils se synthétisent perpendiculairement aux centrioles déjà présents appelés centrioles pères. Deux centrosomes se séparent héritant chacun d'un centriole père et d'un centriole fils (Urbani and Stearns, 1999).

Les phases de la mitose préparent la ségrégation égale du matériel génétique entre les deux cellules filles. Pendant la prophase, l'ADN se condense pour former les chromosomes, structures très ordonnées et individualisées. Aussi, les centrioles pères se séparent entraînant avec eux leur centriole fils. Une paire va rester sur place et l'autre va migrer au pôle opposé de la cellule, formant les deux pôles du fuseau mitotique (pour revue voir (Azimzadeh and Marshall, 2010)). La cellule possède alors deux MTOC constitués d'une paire de centriole appelée diplosome. Ils vont permettre la nucléation et la mise en place des fibres de microtubules qui vont ensuite s'organiser pour constituer le fuseau mitotique bipolaire (**Figure 4**).



Interphase

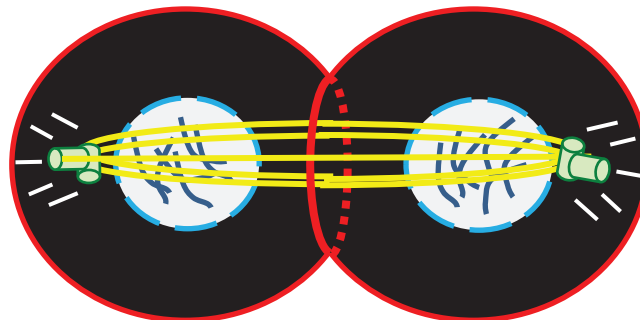
Prophase



Prométaphase

Métaphase

Anaphase



Télaphase

**Figure 4 : Les différentes phase de la Mitose.** Pendant l'Interphase, l'ADN et les centrosomes se répliquent. En Prophase, l'un des centrosome migre au pôle opposé de la cellule, le fuseau mitotique commence à se former et l'ADN se condense pour former les chromosomes. En fin de Prophase (Prométaphase), les chromosomes sont rattachés aux microtubules kinétochoriens, ce processus leur permet de s'aligner à l'équateur de la cellule en Métaphase. L'Anaphase marque la ségrégation des chromosomes. Le fuseau mitotique tire sur les chromosomes. Les chromatides se séparent et les centrosomes s'éloignent. La Télaphase ou Cytokinèse est la dernière phase de la Mitose, les cellules filles se séparent. Cette étape est marquée par la formation d'un anneau contractile constitué de filaments d'actine situé au niveau de la plaque Métaphasique. Le fuseau mitotique central (en jaune) forme alors le corps central.

C'est à la métaphase que le fuseau mitotique prend forme, les fibres des différents types de microtubules se polymérisent pour permettre l'alignement des chromosomes au niveau de la plaque équatoriale de la cellule. Les fibres kinétochoriennes interagissent avec les kinétochores, des complexes de protéines spécialisés situés au niveau du centromère de chaque chromatide et alignent les chromosomes au niveau de la plaque équatoriale de la cellule en s'équilibrant en elles (Kirschner and Mitchison, 1986) : des tensions sont exercées de manière bidirectionnelle sur les centromères jusqu'à ce que les chromosomes s'alignent au niveau de la plaque équatoriale ou métaphasique. Les fibres interpolaires se polymérisent et se rencontrent au niveau de la plaque équatoriale pour former un réseau antiparallèle (**Figure 4**). Quant aux fibres astrales, elles se polymérisent vers le cortex de la cellule pour ensuite y ancrer le fuseau mitotique. Pendant la métaphase, la position du fuseau mitotique n'est pas fixe; il oscille, effectue des rotations jusqu'à se stabiliser selon une certaine orientation très précise et régulée. Les travaux de Roszko et ses collaborateurs montrent, grâce à l'utilisation de dominants négatifs contre la voie RhoA GTPase au niveau de la moelle épinière d'embryons de poulet visualisés en vidéo-microscopie, que des perturbations de ses oscillations métaphasiques altèrent l'orientation finale du fuseau mitotique (Roszko et al., 2006).

Durant l'anaphase, les fibres kinétochoriennes exercent des tensions sur le centromère des chromosomes, les deux chromatines sœur de chaque chromosome se séparent et sont tractées vers les pôles opposés de la cellule par dépolymérisation des microtubules kinétochoriens et la présence de moteurs de dynéines (qui se déplacent vers l'extrémité négative des microtubules). Ceci permet la ségrégation du matériel génétique entre les deux cellules filles. Les fibres interpolaires coulissent entre elle grâce aux moteurs de kinésine qui se déplacent vers l'extrémité positive des deux fibres antiparallèles en contact et permettent ainsi aux deux centrosomes de s'éloigner l'un de l'autre ce qui, participe indirectement à la ségrégation des chromosomes. Les fibres astrales permettent aussi au MTOC de s'éloigner en même temps que les chromatines se séparent. Ceci grâce aux moteurs de Dynéines attachés au cortex qui se déplacent vers l'extrémité négative des





microtubules (pour revue voir : (Meunier and Vernos, 2012) et (Walczak and Heald, 2008)) (**Figure 4**).

La télophase ou cytokinèse correspond à la dernière phase de la mitose et marque la séparation des deux cellules filles. Un anneau contractile constitué d'actine et de myosine se met en place au niveau de la plaque équatoriale de la cellule. La membrane plasmique s'invagine et se déforme par enroulement de l'anneau contractile. Une constriction de la cellule en découle, se poursuivant jusqu'à l'obtention d'un pont intracellulaire entre les deux cellules naissantes grâce à des moteurs de kinésine et des protéines telles que la kinase Aurora B, RhoA-GTPase et des Septines. Ceci est accompagné de fusion de vésicules de membrane puis les cellules filles se séparent (pour revue voir (Green et al., 2012)) (**Figure 4**).

### **c. Les points de contrôle du fuseau mitotique**

Lors du cycle cellulaire de nombreux points de contrôle sont établis pour que la cellule se divise correctement et pour assurer une ségrégation des chromosomes identiques entre les deux cellules filles.

Un point de contrôle important de la mitose, est de vérifier que chaque microtubule kinétochorien est bien attaché aux kinétochores de chaque côté des chromosomes. La tension créée par les microtubules lorsqu'ils interagissent avec les centromères est un facteur crucial détecté par des senseurs protéiques (comme AuroraB) et qui permet de passer à l'étape suivante : l'anaphase (Li and Nicklas, 1995). Au contraire, le manque de tension va activer des voies de correction pour ensuite pouvoir passer en anaphase. Peter et ses collaborateurs ont mis en évidence qu'un complexe de contrôle mitotique (MCC) contenant des protéines comme MAD2 (mitotic arrest deficient 2), Bub1, Bub3 ou Bubr1, retarde la progression de la mitose en protégeant la Cycline B (Cdk1) et la Sécurine de l'ubiquitinylation et de la dégradation protéosomique tant que certains chromosomes ne sont pas alignés dans la plaque métaphasique (Peters, 2006). Le MCC empêche ainsi la cellule d'entrer en anaphase. Cette action permet d'éviter une mauvaise ségrégation des chromosomes entre les deux cellules filles et ainsi créer une aneuploïdie ou une polyploïdie (Chen



et al., 1996; Holland and Cleveland, 2009). Une fois que les fibres kinétochoriennes interagissent avec les kinétochores de manière bipolaire induisant des tensions symétriques entre les deux chromatines, le MCC est inhibé, Cdk1 est dégradée et la cellule passe en anaphase (pour revue voir : (Pinsky and Biggins, 2005) et (Musacchio, 2011)).

D'autres défauts peuvent activer ce point de contrôle comme une dépolymérisation du fuseau, des protéines kinétochoriennes défectueuses ou même un dysfonctionnement des moteurs moléculaires (dynéine ou kinésine). Comme par exemple, dans les travaux de Li *et al.* ou de Wang et Burke, où un traitement au Bénomyl ou au nocodazole dépolymérise les microtubule chez la levure. L'activation de la voie MAD2 permet un retard ou un arrêt de la mitose, chez les mutants MAD2, la non activation du point de contrôle conduit à la mort des cellules (Li and Murray, 1991; Wang and Burke, 1995).

#### **d. La position du fuseau mitotique influe sur plan de séparation des cellules filles**

Nous l'avons rapidement évoqué dans la description de la cytokinèse, l'orientation du fuseau mitotique a un impact direct sur l'emplacement du site de séparation des cellules filles. En effet, le plan de séparation des cellules filles se positionne au niveau du fuseau mitotique central (ou midzone spindle) situé au niveau de la plaque équatoriale en fin d'anaphase (composé surtout de microtubules interpolaire). En fin d'anaphase un anneau contractile, constitué d'actomyosine, se met en place au niveau de la plaque équatoriale et se contracte jusqu'à rejoindre le fuseau mitotique central pour former le corps central (midbody) en resserrant les microtubules entre eux. Le corps central forme un pont intracellulaire qui connecte les deux cellules filles (Hu et al., 2012) (**Figure 4**).

Quels sont les signaux qui induisent sa formation à cet endroit précis de la cellule ? Différents modèles ont été décrits afin d'expliquer la formation du site de clivage au niveau de l'équateur de la cellule et non au niveau des pôles du fuseau mitotique (pour revue voir (D'Avino et al., 2005)). Au niveau des pôles de la cellule,



des signalisations pourraient provenir des microtubules astraux afin d'y inhiber la formation de site de clivage. Ce modèle a été établi par Canman et Kurz en observant qu'une dépolymérisation des microtubules (par une drogue comme le nocodazole) induit la formation de zones de clivage ectopique chez les mammifères ou *C.elegans* (Canman et al., 2000; Kurz et al., 2002). De même Bellanger et Gonczy ainsi que Matthews et ses collaborateurs montrent qu'un raccourcissement des microtubules astraux chez *C.elegans* (par l'inactivation de protéines requises pour leur croissance, comme TAC-1 ou ZYG-9), cause une orientation transversale du fuseau mitotique ainsi que des sillons de clivages ectopiques (Bellanger and Gonczy, 2003; Matthews et al., 1998). Ce modèle peut être controversé par le fait que ces traitements ont des effets sur la dynamique du fuseau mitotique et l'activité de l'actine corticale, menant en fin de compte à la formation de sites de clivage ectopiques. Les travaux de Dechant et Glotzer en 2003, avaient aussi proposé un rôle de la séparation des centrosomes ainsi que de la densité des microtubules présents au niveau du cortex de la cellule dans la formation du site de clivage (une faible densité favorisant sa formation). Cette hypothèse n'explique pas les résultats obtenus avec les mutants TAC-1 ou ZYG-9 (Dechant and Glotzer, 2003)

Un autre modèle propose que des signaux proviendraient du fuseau mitotique central, menant à la formation du corps central suite à la réorganisation des microtubules. Ceci permettrait la localisation précise de l'anneau contractile à l'équateur de la cellule. De récents travaux menés par Bement *et al.* montrent que des protéines de signalisation présentes au niveau du fuseau central, comme les protéines Ect2 ou Pebble, vont activer localement la GTPase RhoA, au niveau du cortex équatorial (Bement et al., 2006). La signalisation RhoA va ensuite recruter les éléments constituant l'anneau contractile comme la myosine, l'actine ou des filaments de septines (Goode and Eck, 2007) en activant différentes voies de signalisation comme la voie Lim kinase, Citron Kinase permettant la contraction de l'actine (pour revue voir (Green et al., 2012) et (Glotzer, 2001). Nous pouvons penser que ces deux modèles existent afin de définir très précisément le site de clivage de la cellule mère pour engendrer deux cellules filles.

Nous avons vu en quoi l'orientation de la division cellulaire est dépendante du positionnement du fuseau mitotique. Nous allons maintenant présenter dans quelle



mesure l'orientation des divisions est contrôlée dans de nombreux contextes développementaux et en quoi cette orientation a un rôle majeur dans le développement.

## **2. Implication de l'orientation du fuseau mitotique pendant le développement**

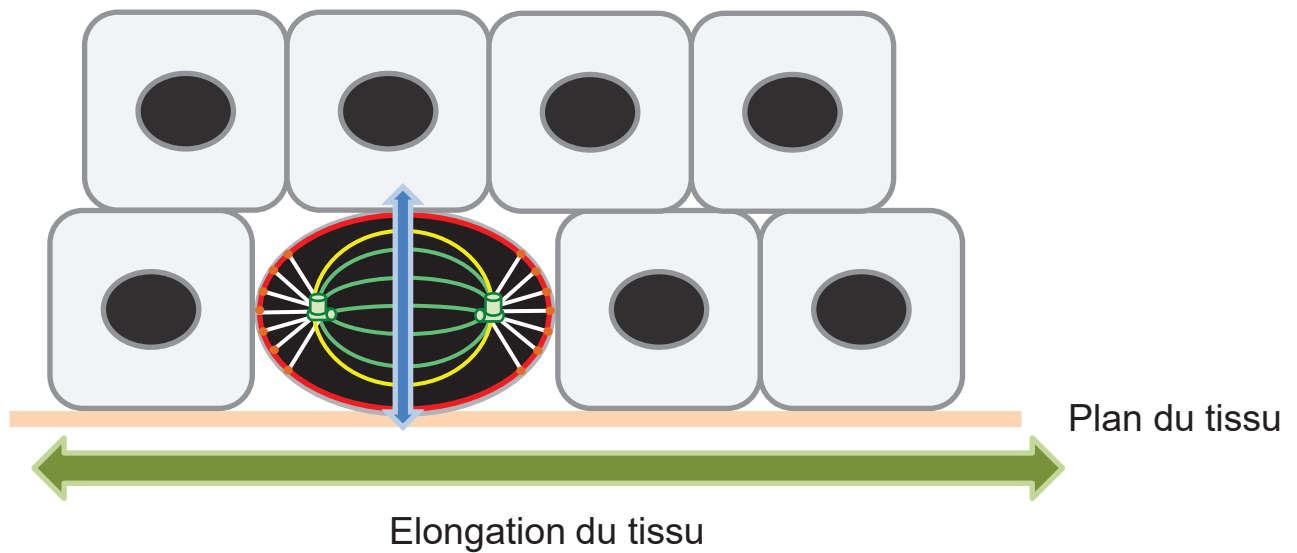
Dans de nombreuses situations développementales, l'orientation des divisions cellulaires n'est pas aléatoire, elle relève d'angles en proportions bien définies. La perturbation de ces orientations par des contraintes physiques ou des manipulations génétiques peut aboutir à des altérations du développement irréversibles qui montrent que ce paramètre est crucial. En effet, des altérations de l'orientation des divisions cellulaires mènent à des défauts de l'architecture des tissus, de spécification des cellules et provoque des cancers (Pease and Tirnauer, 2011). Nous allons présenter quelques exemples illustrant l'impact majeur de l'orientation des divisions cellulaires dans le développement.

### **a. L'orientation du fuseau mitotique contrôle la forme des tissus**

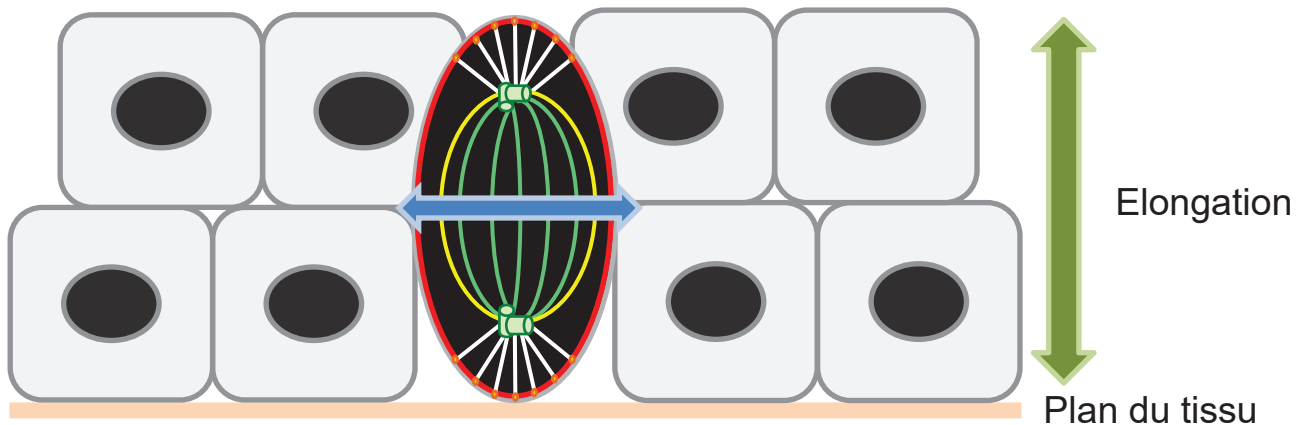
Le taux de divisions cellulaires est un processus très contrôlé qui permet de sculpter en grande partie les différentes régions de notre organisme. La forme et l'architecture des tissus sont par ailleurs une conséquence de l'arrangement spatial des cellules pendant le développement. Un moyen de modeler l'arrangement des cellules est d'orienter les divisions cellulaires. En effet, les divisions cellulaires peuvent s'effectuer dans différentes orientations ce qui conduit à des positions finales des cellules filles différentes (Castanon and Gonzalez-Gaitan, 2011). Par exemple, les divisions parallèles au plan du tissu génèrent des cellules filles dans le plan du tissu. Pour cela, les pôles de leur fuseau mitotique, les centrosomes, sont placés de manière parallèle à ce plan et le plan équatorial ainsi que le sillon de clivage des cellules se place de manière perpendiculaire à ce plan. Nous parlerons pour ces divisions de divisions planaires. Les divisions obliques au plan du tissu permettent de générer des cellules filles en profondeur par rapport au plan du tissu.



### A) Division planaire



### B) Division oblique



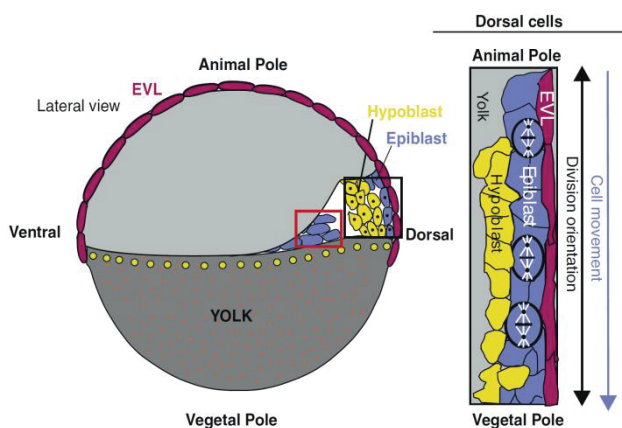
**Figure 5 : Les divisions planaires et obliques . A)** Les divisions planaires sont parallèles par rapport au plan du tissu. Elles permettent une élévation du tissu dans son plan. Le plan de division est placé de manière perpendiculaire par rapport au plan du tissu (angle de  $90^\circ$ ). **B)** Les divisions obliques sont perpendiculaires par rapport au plan du tissu et permettent une élévation de celui-ci en profondeur, cela crée de nouvelles couches de cellules. Le plan de division est placé de manière parallèle par rapport au plan du tissu (angle de  $0^\circ$ ).

Les centrosomes se placent alors de manière oblique par rapport à ce plan et le plan équatorial ainsi que le sillon de clivage des cellules. Nous parlerons pour ses divisions de divisions obliques (ou perpendiculaires dans certains cas) (**Figure 5**).

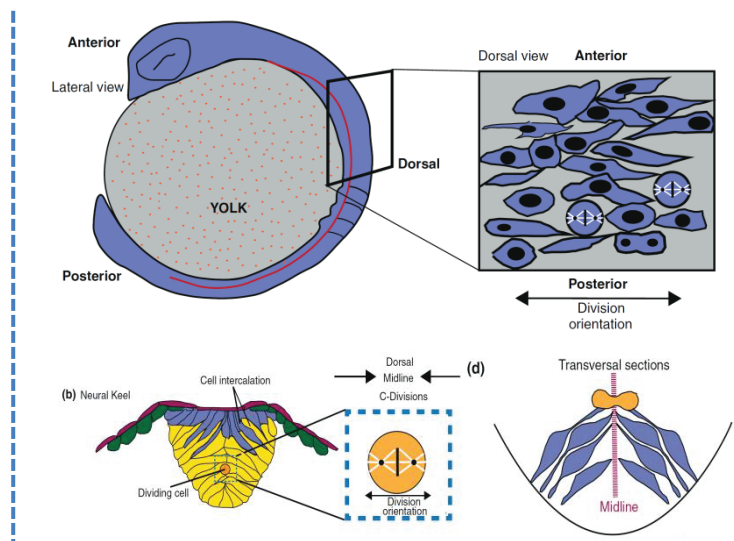
Ainsi, l'étude de la relation entre l'orientation du fuseau mitotique et l'organisation et la forme des tissus ont été effectuées chez de nombreuses espèces de vertébrés comme d'invertébrés (Drosophile, Xénope, poisson zèbre, souris, poulet). Des cas d'orientations planaires menant à une élongation des tissus sont retrouvés par exemple chez le poisson zèbre pendant sa gastrulation ; où l'élongation du tissu épiblastique s'effectue vers le pôle végétatif grâce à des divisions planaires par rapport à l'axe animal-végétatif (Concha and Adams, 1998) (**Figure 6A**). Ou bien pendant les stades précoces du développement de la Drosophile, où les cellules se divisent préférentiellement de manières planaire au plan antéro-postérieur (da Silva and Vincent, 2007). Une perturbation de l'orientation de ces angles peut induire des altérations de la taille du tissu et de la forme des tissus (da Silva and Vincent, 2007).

En plus de l'élongation des tissus dans un axe particulier, l'orientation des divisions permet aussi de générer des tissus constitués de plusieurs couches de cellules ou de former un tube creux. C'est le cas des épithéliums, où des cellules se divisent perpendiculairement à la surface du tissu pour générer un tissu pluristratifié et de la neurulation chez le poisson zèbre. Au niveau des épithéliums, les cellules se divisent perpendiculairement à la surface du tissu pour générer un tissu pluristratifié. La stratification nécessite un changement de l'axe des divisions : au départ, les cellules se divisent préférentiellement dans le plan de l'épithélium (de manière planaire) puis le changement de l'orientation des divisions permet de placer la cellule fille perpendiculairement au plan du tissu, ce qui génère une couche. Ce principe est retrouvé au niveau du développement de l'épiderme de la souris au stade embryonnaire E15 (Lechler and Fuchs, 2005; Poulson and Lechler, 2010) (**Figure 7**). La génération de couches cellulaires ne s'effectuent pas seulement au niveau des épithéliums, mais aussi à des stades très précoces de développement comme chez le Xénope au stade 32 cellules : les premières divisions de l'embryon s'effectuent de manière planaire ce qui permet leur multiplication dans un plan donné, puis des

## A) Gastrulation



## B) Neurulation



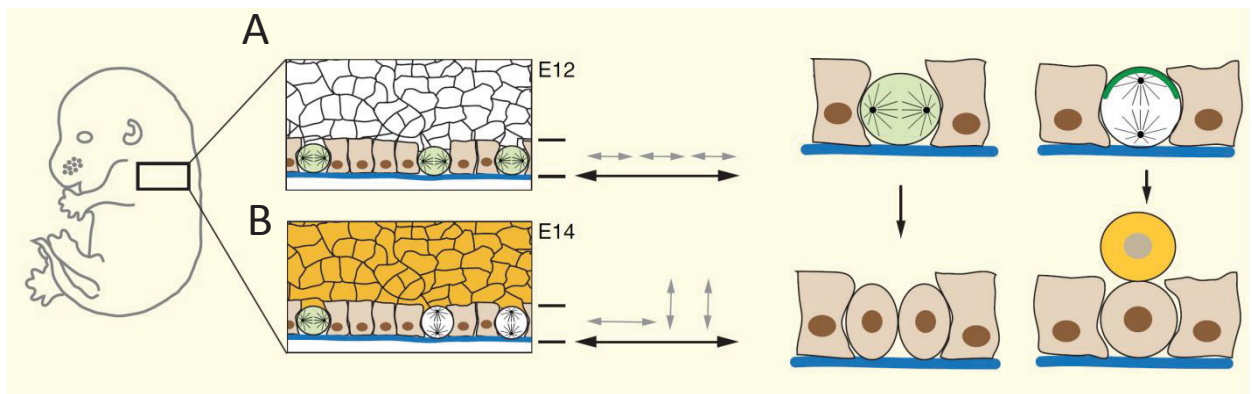
D'après Castanon *et al.* 2011

**Figure 6 : A) Gastrulation et B) Neurulation chez le poissons zèbre. A)** Pendant la gastrulation, les cellules de l'épiblaste se divisent de manière planaire par rapport au plan animal-végétatif. Ceci amène à une elongation du tissu vers le pôle végétal. **B) Les cross-divisions :** Durant la neurulation, au stade 3-somites, les cellules se divisent de manière perpendiculaire à l'axe antéro-postérieur (animal-végétatif), une rotation de 90° de l'axe de division a été préalablement effectuée par les cellules pour se diviser de manière médio-latérale. Une des cellules filles générée traverse la ligne médiane, elle effectue une cross-division ce qui permet une distribution bilatérale des progéniteurs.

divisions obliques se mettent en place pour générer des couches de cellules plus profondes et passer du stage Morula à Blastula (Chalmers et al., 2003).

La neurulation chez le poisson zèbre montre des orientations de divisions cellulaires très régulées et particulières (**Figure 6B**). En effet, la formation d'un tube neural à partir d'un cordon neural dépend de divisions cellulaires, dont l'orientation très stéréotypée, génère des progéniteurs neuraux distribués de manière bilatérale. Ainsi, le cordon neural tout d'abord plein, se creuse progressivement en une cavité. Les cellules profondes qui constituent la plaque neurale au début de la neurulation se divisent selon l'axe médio-latéral ce qui nécessite aussi une rotation de 90° de leur fuseau mitotique (pendant la gastrulation, ces cellules se divisaient selon l'axe animal-végétatif (Concha and Adams, 1998)). Les cellules filles ainsi générées traversent la ligne médiane, ce type de division est appelé cross-division. Zigman et ses collaborateurs ont perturbé l'orientation de ces divisions de différentes manières ; tout d'abord en utilisant la cytochalasin D, un inhibiteur de la dynamique de l'actine. Puis, ils se sont intéressés à la protéine Scribble (Scrib), impliquée dans l'organisation de l'actine et dans la polarité apico-basale et les jonctions épithéliales (comme l'E-cadhérines) (Bilder and Perrimon, 2000; Dow et al., 2007). La réduction de Scrib empêchant le recrutement efficace de l' $\alpha$ -caténine au niveau apical des cellules mitotique, est responsable de défauts d'orientation du fuseau mitotique. Cette altération de l'orientation de ces divisions dans le neuroépithélium empêchent les progéniteurs fils de traverser la ligne médiane et provoque une distribution unilatérales des progéniteurs (Zigman et al., 2011).

Le taux de division cellulaire ainsi que la dynamique de l'orientation des angles de division au fur et à mesure du développement permet ainsi la croissance du tissu dans un axe particulier que ce soit l'élongation ou l'épaisseur du tissu et participe ainsi à sa sculpture.



D'après Gillies *et al.* 2011

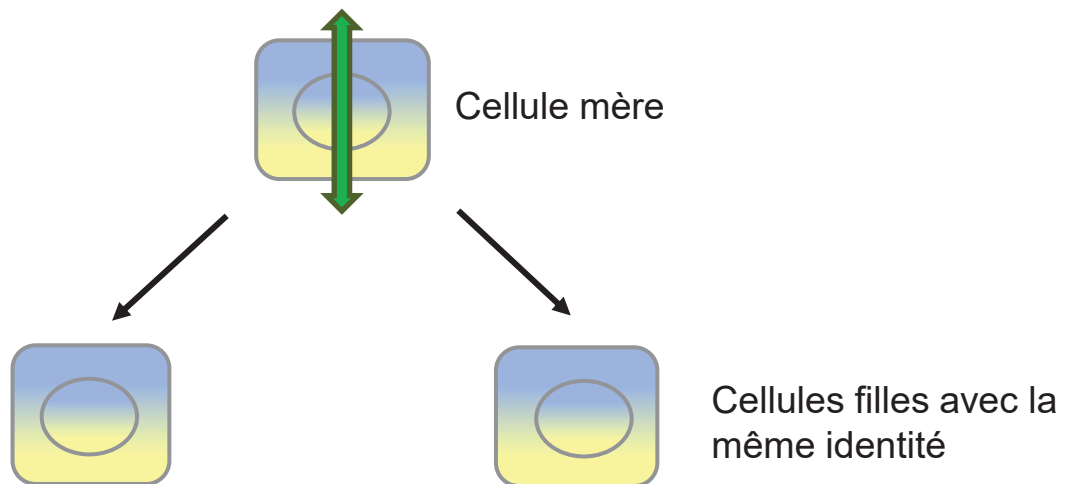
**Figure 7 : Les divisions planaires et perpendiculaires au niveau de l'épiderme de souris. A. Stade embryonnaire E12:** les cellules se divisent de manière planaire au plan de l'épithélium ce qui permet une élongation du tissu dans ce même plan (flèches grises). **B. Stade embryonnaire E15,** les cellules se divisent de manière perpendiculaire au plan du tissu afin de générer des cellules filles en Z pour permettre la formation d'une couche profonde du tissu.

## **b. L'orientation du fuseau mitotique participe à la spécification de nombreux types cellulaires**

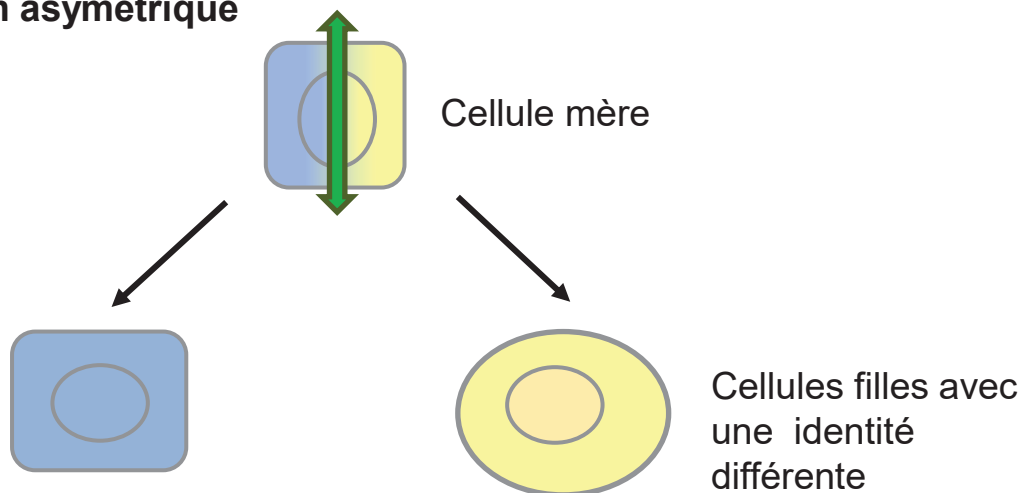
Pour former des tissus et organes fonctionnels, il faut en plus d'une forme stéréotypée, une diversité cellulaire afin d'assurer les fonctions complexes des différents organes. L'orientation des divisions participe à la génération de cette diversité cellulaire. En effet, au sein d'une cellule il existe des déterminants cytoplasmiques du destin cellulaire. Ces déterminants sont des ARNm, des protéines correspondant à des facteurs de transcription ou de signalisation, qui vont permettre à la cellule de se différencier et d'acquérir une identité. Nous parlons de division symétrique lorsque ces déterminants sont partagés de manière équivalente entre les deux cellules filles après une division cellulaire (**Figure 8**). Ce type de division génère deux cellules ayant la même identité (par exemple, dans la moelle épinière, embryonnaire chez les vertébrés, un progéniteur neural peut se diviser de manière symétrique pour donner deux progéniteurs neuraux (identiques à la cellule mère) ou bien deux neurones) (Huttner and Kosodo, 2005). Au contraire, en partageant inégalement la cellule mère, une division asymétrique va créer de la diversité cellulaire en engendrant deux cellules filles aux identités distinctes héritant de déterminants différents. Si nous reprenons l'exemple du tube neural, lorsque la neurogénèse débute, le progéniteur neural peut subir une division asymétrique et générer un progéniteur et un neurone (cellule dite post mitotique, c'est-à-dire qui a quitté son cycle cellulaire de manière définitive). Il est important de noter que ces termes de division symétrique et asymétrique sont utilisés pour décrire l'héritage de déterminants cytoplasmiques de la cellule mère et le destin des cellules filles (et non l'angle avec lequel elle se divise). Dans la littérature, la confusion existe entre les différents termes ; il n'est pas rare de voir écrit division asymétrique en parlant de division oblique. La division asymétrique est utilisée dans de nombreux systèmes pendant le développement de beaucoup d'espèces.

Les divisions asymétriques ont ainsi deux rôles principaux : générer de la diversité cellulaire et conserver un groupe de progéniteurs capables de proliférer (**Figure 8**). Les divisions asymétriques ont été étudiées en détail dans des modèles comme *C. elegans*, les neuroblastes et les précurseurs d'organes sensoriels de la *Drosophile*, le neuroépithélium chez les amniotes ainsi que l'épiderme de la souris.

### A) Division symétrique



### B) Division asymétrique



**Figure 8 : Les divisions symétriques et asymétriques. A)** Lors d'une division symétrique, les déterminants cytoplasmiques du destin cellulaire (représentés en bleu et jaune) sont hérités par les cellules filles de manière égale. Ceci amène à la génération de deux cellules filles au destin identique. **B)** Lors d'une division asymétrique, les déterminants cytoplasmiques du destin ne sont pas hérités de manière égale par les deux cellules filles. Il en résulte, deux cellules au destin différent. En fonction de la disposition des déterminants du destin et de l'orientation du fuseau mitotique, la division est symétrique ou asymétrique.

Nous allons en voir quelques exemples pour illustrer le rôle de l'orientation du fuseau mitotique dans ces processus.

La première division de la cellule œuf chez *C. elegans* est un bon exemple de mise en place de division asymétrique liée à la polarité antéro-postérieure. Tout d'abord, après la fécondation une « cassure » de la symétrie de la cellule œuf est observée. La cellule devient polarisée et des déterminants du destin cellulaire sont ségrégués de manière asymétrique à chaque pôle de la cellule (antérieur et postérieur), ceci, grâce à une réorganisation du réseau d'actomyosine. Le fuseau mitotique se met en place au centre de la cellule œuf puis il est tiré vers le pôle postérieur grâce à des interactions avec le cortex de la cellule, ce qui forme un large blastomère antérieur et un petit au pôle postérieur (Hyman and White, 1987). Le positionnement du fuseau mitotique permet le partage distinct des déterminants cytoplasmiques entre les deux cellules filles. La division de la cellule œuf génère alors deux cellules filles aux identités différentes (pour revue voir (Galli and van den Heuvel, 2008)). Les travaux de Hyman et White ainsi que Tsou et ses collaborateurs montrent qu'une perturbation de la cassure de la symétrie de la cellule œuf ou de la polarité des blastomères (par une altération de l'expression des protéines de polarité comme PAR3) ou même du tractage du fuseau mitotique vers le pôle postérieur par une altération du réseau de microtubules (causé par un traitement au nocodazole) mène à une altération de la division asymétrique de la cellule œuf et à un arrêt du développement de l'embryon (Hyman and White, 1987; Tsou et al., 2003).

Des divisions asymétriques générant de la diversité cellulaire sont retrouvées au niveau des neuroblastes de la *Drosophila* et dans le neuroépithélium des vertébrés. Chez la *Drosophila* des déterminants du destin (Numb ou Prospero) sont polarisés au niveau du pôle basal du neuroblaste. Une orientation du fuseau mitotique est alors observée en fonction de la polarité interne de la cellule qui a été préalablement établie (confère partie I.3.a.). Les neuroblastes se divisent de manière oblique ou perpendiculaire par rapport à l'axe apico-basal. Cette division asymétrique génère une cellule mère ganglionnaire (qui hérite de Numb et Prospero) et un neuroblaste, héritant de la membrane apicale ce qui permet de maintenir le nombre de progéniteurs (Cabernard and Doe, 2009). Cai et ses collaborateurs ont perturbé des voies contrôlant l'orientation oblique des divisions des neuroblastes. Ces





manipulations ont conduit à des divisions symétriques au lieu de divisions produisant un petit neuroblaste et une plus grosse cellule mère ganglionnaire. Ces travaux montrèrent donc que l'orientation des divisions était un paramètre crucial du contrôle des destins cellulaires (Cai et al., 2003).

Au niveau du neuroépithélium chez les vertébrés, les progéniteurs neuraux sont aussi polarisés : ils possèdent un pied d'ancrage du côté apical composé de jonctions adhérentes et un pied basal de structure très différente. Ces progéniteurs suivent une première phase d'amplification, dite proliférative puis une phase dite neurogénique donnant naissance à des neurones. Certaines expériences montrent que, pendant la phase de prolifération, le progéniteur neural se divise de manière symétrique et planaire par rapport au plan apico-basal ce qui permet le partage égal des éléments qui polarisent la cellule, dont le pied apical. Les cellules filles générées sont alors deux progéniteurs. Ensuite, pendant la phase de neurogénèse, des divisions asymétriques par rapport au plan apico-basal se mettent en place et génèrent par exemple un progéniteur neural et un neurone. Chenn et McConnell en 1995 ont proposé que l'orientation du fuseau permettrait de générer de la diversité cellulaire et contrôlerait le destin des cellules filles (Chenn and McConnell, 1995). Toutefois, plusieurs études ont ensuite remise en question cette hypothèse. Konno, Morin et leurs collaborateurs, ont montré qu'une perturbation de l'orientation des angles de divisions planaires par une altération des protéines impliquées dans l'orientation du fuseau ne mènait pas à une neurogénèse prématurée. En revanche, des progéniteurs ectopiques étaient alors retrouvés dans le tube neural de la souris (Konno et al., 2008) et du poulet (Morin et al., 2007). Ces résultats indiquent que l'orientation des divisions cellulaires des progéniteurs a un rôle crucial dans le contrôle de l'ancrage des progéniteurs au niveau apical du neuroépithélium, et par conséquent dans l'intégrité de l'architecture du tissu. En revanche, son rôle dans le contrôle du destin des cellules filles est encore très controversé dans ce contexte.

Tous ces exemples illustrent le rôle important de l'orientation du fuseau mitotique dans le développement. Il permet de contrôler la morphogenèse des tissus soit : leur forme, leur architecture ainsi que la spécification des cellules qui les constituent et leur homéostasie.



### **3. Les mécanismes impliqués dans l'orientation du fuseau mitotique**

Quels sont les mécanismes qui régulent l'orientation du fuseau mitotique ? Nous pouvons regrouper ces mécanismes en deux catégories : des mécanismes intrinsèques, médiés par des signalisations qui agissent de l'intérieur de la cellule et des mécanismes extrinsèques, qui font intervenir des signaux extracellulaires, présents dans l'environnement de la cellule.

#### **a. Les mécanismes intrinsèques qui participent à l'orientation du fuseau mitotique**

Plusieurs mécanismes intrinsèques participent au contrôle de l'orientation du fuseau mitotique : les moteurs moléculaires interagissant avec les microtubules par exemple, permettent la traction du fuseau mitotique dans une orientation particulière. Quelle est leur nature, où s'ancrent-ils et de quelle manière ? La polarité intrinsèque de la cellule, marquée par la présence de protéines spécifiquement localisées, est aussi impliquée dans les processus d'ancrage et de positionnement du fuseau. Nous montrerons ensuite, que d'autres voies de signalisation intervenant sur le cytosquelette peuvent contrôler l'orientation du fuseau mitotique.

##### *i. Le rôle des moteurs moléculaires dans la mise en place du fuseau mitotique*

Nous avons détaillé dans la première partie de ce I. la structure et la composition du fuseau mitotique ainsi que sa dynamique évoluant en fonction du cycle cellulaire. Cette dynamique fait intervenir des moteurs moléculaires : les dynéines et les kinésines qui interagissent avec les fibres microtubulaires. Pour se positionner, le fuseau mitotique doit attacher les fibres astériennes au cortex de la cellule. Cet ancrage repose sur l'interaction des moteurs de dynéines, au cortex avec les fibres astériennes. Les dynéines vont se déplacer sur les microtubules de leur pôle positif vers leur pôle négatif. Ces mouvements ont pour conséquence de tirer

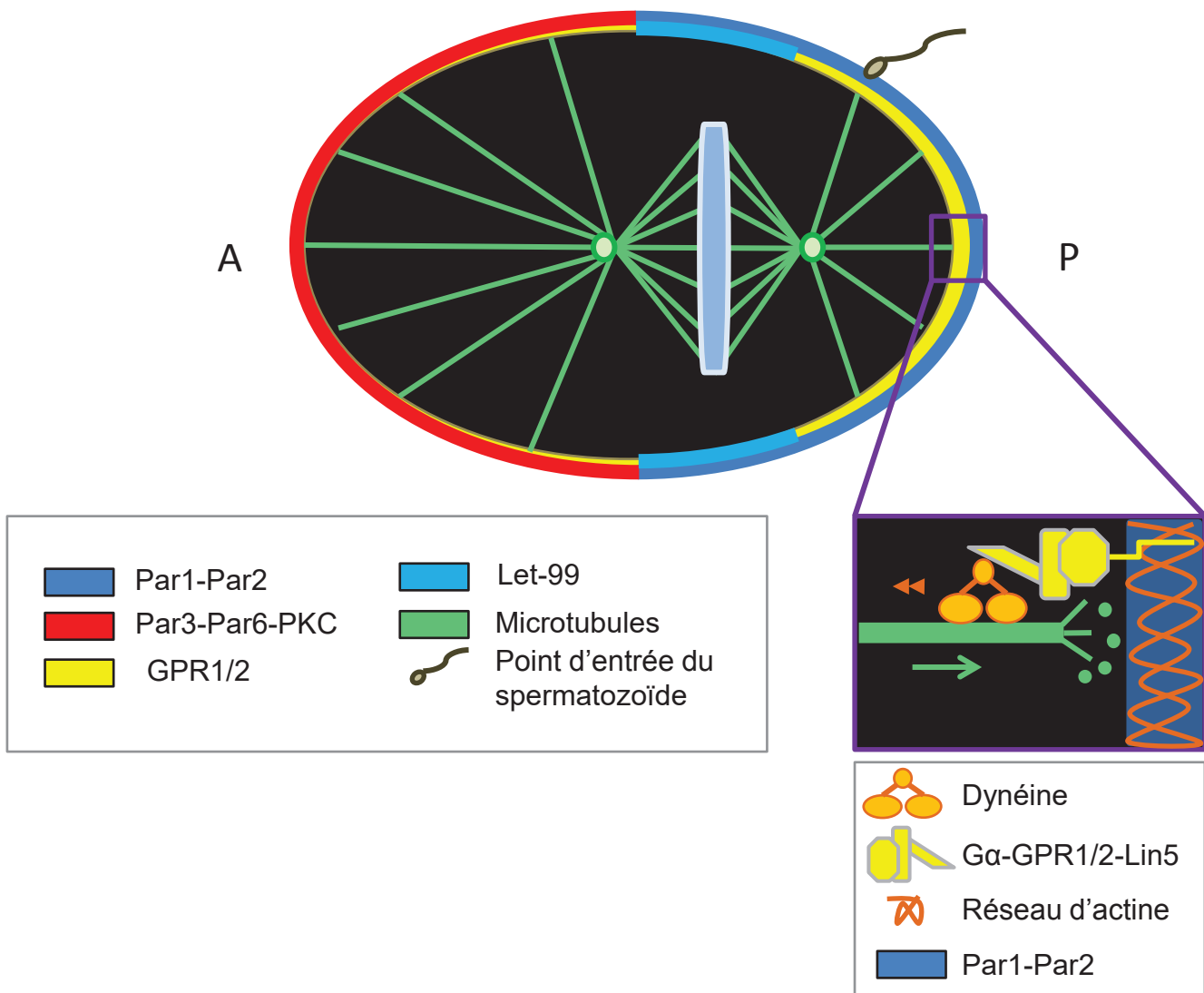


les microtubules vers le cortex jusqu'à ce que le système s'équilibre et que les tensions de traction entre les deux pôles de la cellule soient équivalentes (Du and Macara, 2004; Merdes et al., 1996) (pour revue voir : (Meunier and Vernos, 2012) et (Walczak and Heald, 2008)). L'orientation du fuseau mitotique dépend donc en premier lieu de la position de ces moteurs de dynéines.

Une question se pose alors : comment ces moteurs sont disposés dans le cortex cellulaire ? Sachant que la position et l'orientation du fuseau mitotique sont contrôlées et que la localisation des points de fixation préfigure l'orientation du fuseau mitotique les moteurs doivent être positionnés à des endroits très précis, quels sont les mécanismes responsables de leur positionnement ?

## ii. *L'ancrage des microtubules au cortex cellulaire*

Les moteurs de dynéines, interagissant avec les microtubules du fuseau mitotique, sont rattachés à la membrane via un complexe protéique très conservé : Gai/LGN/NuMA chez les vertébrés, homologues de Gai/GPR1-2/Lin-5 chez *C.elegans* et Gai/Pins/Mud chez la Drosophile (Bowman et al., 2006; Izumi et al., 2006; Siller et al., 2006). La position de ce complexe définit donc l'orientation du fuseau mitotique. NuMA (pour Nuclear Mitotic Apparatus) a tout d'abord été identifié en association avec LGN (pour Leu-Gly-Asn) (Yu et al., 2000), connu pour être impliqué dans le contrôle des divisions asymétriques chez *C.elegans* (Panbianco et al., 2008). La protéine NuMA a la propriété d'interagir avec les moteurs de dynéine (Markus and Lee, 2011). L'ancrage de LGN et NuMA dans le cortex de la cellule se fait via Gai, appartenant à la famille des petites protéines G, qui interagit avec LGN et la face interne de la membrane plasmique (**Figure 3A**). Les petites protéines G sont connues dans la transduction de signaux à la cellule. Elles possèdent deux formes moléculaires une active, liée au GTP et une inactive, liée au GDP. L'échange du GDP en GTP ou l'hydrolyse du GTP en GDP permet le passage de l'une à l'autre forme. Gai-GDP peut former un complexe trimérique  $G\beta$ - $G\gamma$ -Gai-GDP.. La forme Gai-GTP se dissocie de ce complexe; les sous-unités  $G\beta$ - $G\gamma$  inhibant Gai en empêchant le GTP de s'y fixer. Parallèlement, Gai peut aussi interagir avec LGN, GPR, Pins sous forme Gai-GDP.. Les travaux de Couwenbergs et Gotta ont montré



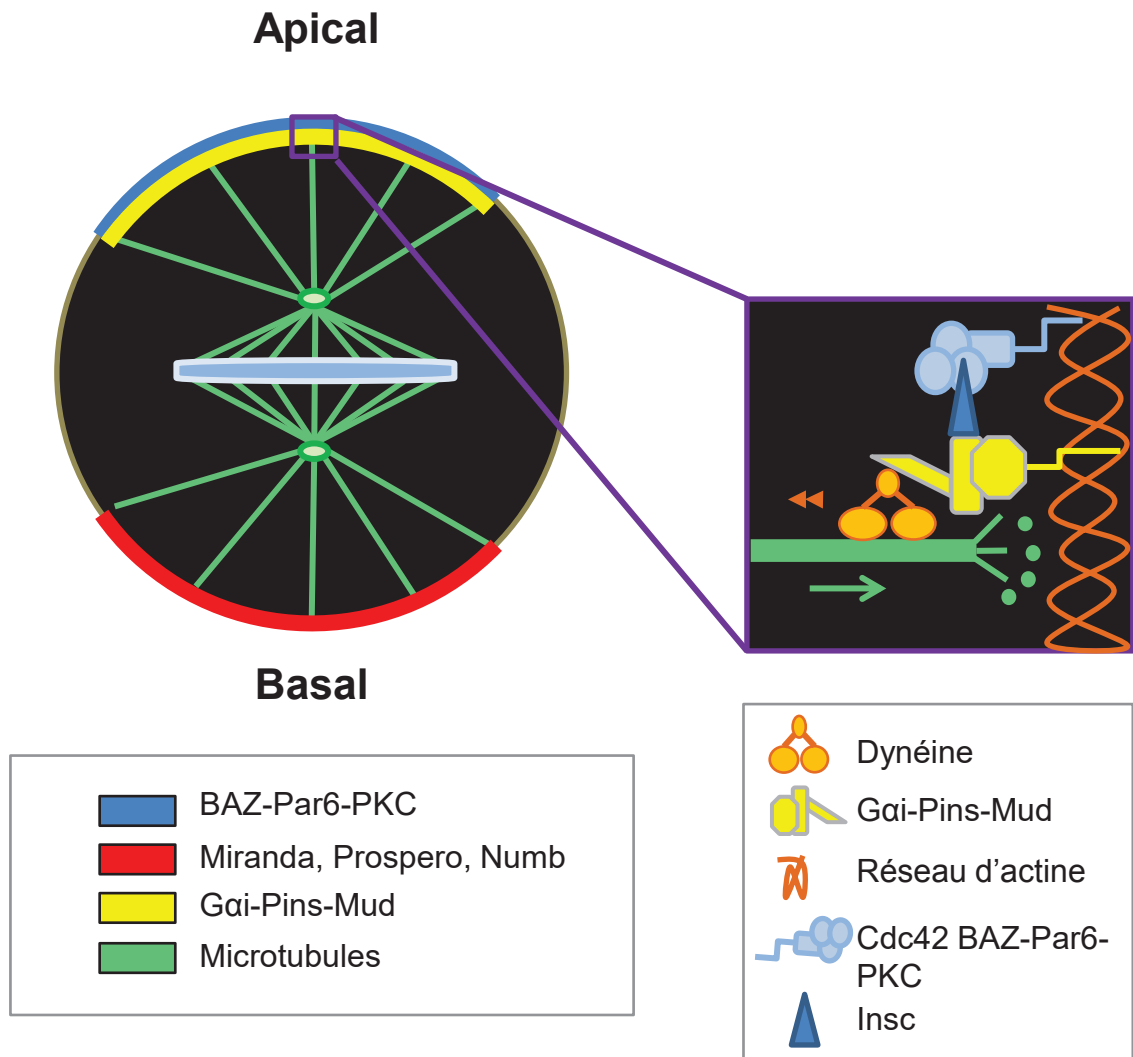
**Figure 9 : Positionnement du fuseau mitotique du zygote chez *C.elegans*.** Les complexes PAR sont localisés asymétriquement. Par1-Par2 recrute GPR1/2 au niveau des Gαi de manière importante. GPR1/2 est plus enrichi au pôle postérieur qu'au pôle antérieur. GPR1/2 interagit avec LIN-5, associée aux moteurs de dynéine ce qui permet une traction du fuseau mitotique vers le pôle postérieur.

chez *C.elegans* qu'une dissociation du trimère et une stabilisation sous la forme -GDP est donc nécessaire pour cette interaction, (Couwenbergs et al., 2007; Gotta et al., 2003).

Plusieurs exemples montrent une corrélation entre la position du fuseau mitotique et la localisation du complexe Gai/LGN/NuMA. Chez le zygote *C.elegans*, nous avons vu dans la partie précédente que le fuseau mitotique est tracté vers le pôle postérieur afin d'effectuer une division asymétrique. Des forces de traction des microtubules sont alors mises en place pour positionner le fuseau mitotique. Une concentration plus importante de GPR1-2 est retrouvée au pôle postérieur, ce qui permet la mise en place d'une forte concentration de LIN-5 et ainsi de forces de traction plus importante. D'où le déplacement du fuseau mitotique vers ce pôle afin de générer deux cellules filles aux identités différentes (Hyman and White, 1987) (pour revue voir (Galli and van den Heuvel, 2008)) (**Figure 9**).

Chez la Drosophile, une localisation asymétrique du complexe est retrouvée dans les neuroblastes (Bellaïche and Gotta, 2005; Sanada and Tsai, 2005). Gai et Pins (l'homologue de LGN) y sont requis pour le positionnement apico-basal du fuseau mitotique et n'y sont retrouvés qu'au niveau du pôle apical de la cellule. Pins interagit alors avec le complexe de polarité apical BAZ-Par6-PKC, la protéine Inscuteable et Gai-GDP, ancrée dans la membrane plasmique apicale via une autre protéine de la famille des RhoGTPase, Cdc42. Pins va ensuite recruter Mud (*mushroom body defect*), l'homologue de NuMA, qui interagit avec les moteurs de dynéine et va permettre ainsi le positionnement du fuseau mitotique (Schaefer et al., 2001; Siller et al., 2006) (**Figure 10**). Le fuseau est positionné au centre dans la cellule contrairement à la première division cellulaire de *C.elegans*, malgré cette localisation asymétrique du complexe Gai/Pins/Mud. Les facteurs responsables de l'ancrage du fuseau au niveau basal sont encore mal connus, nous pouvons supposer qu'un mécanisme similaire existe afin de générer des forces de traction du fuseau mitotique identique à chaque pôle de la cellule. La localisation asymétrique du complexe de polarité BAZ-Par6-PKC permet la génération de deux cellules filles au destin différent, un neuroblaste et une cellule mère ganglionnaire (confère I.2.b.).

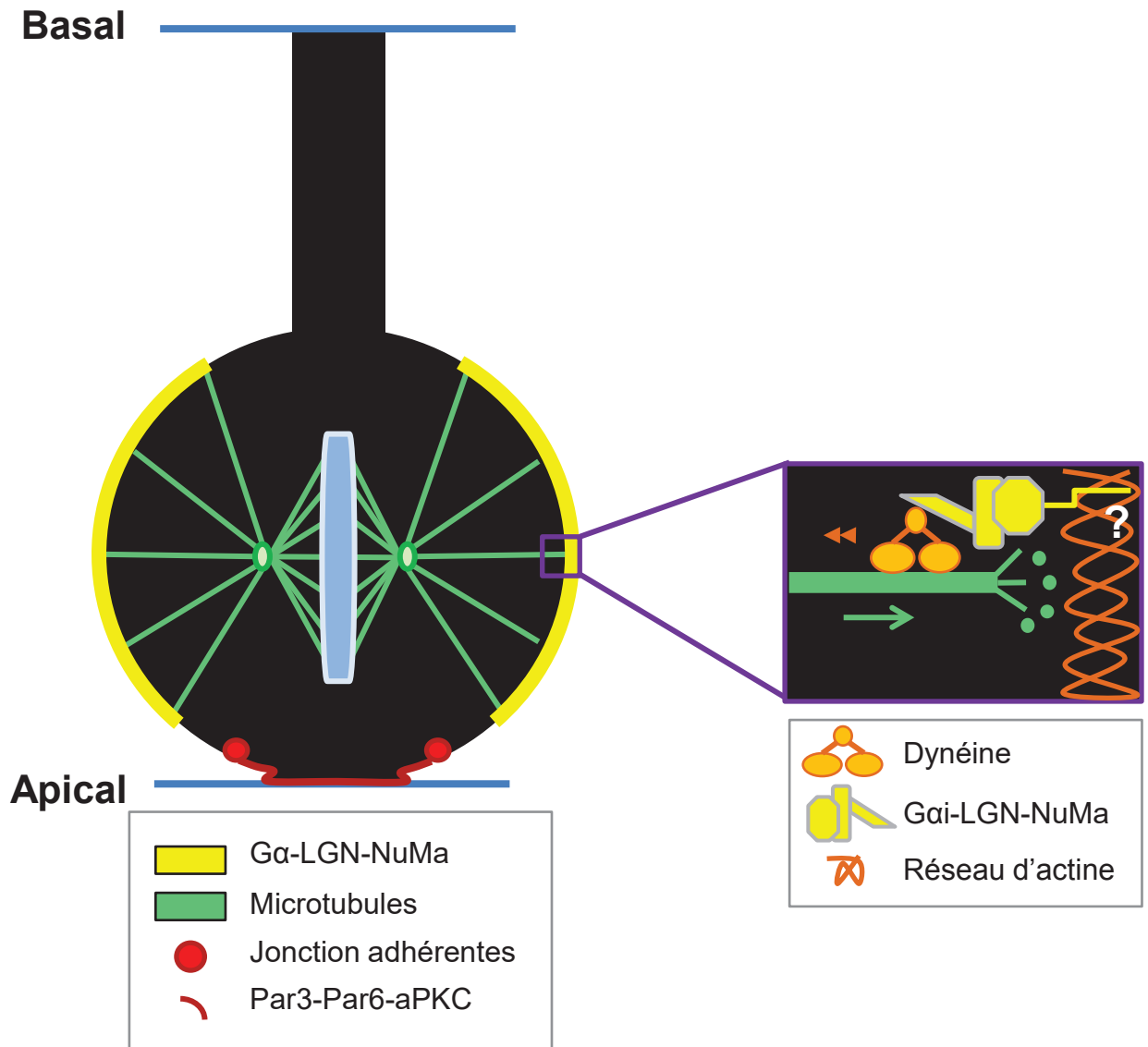




**Figure 10 : Positionnement du fuseau mitotique dans le neuroblaste de *Drosophila*.** Au pôle apical, le complexe BAZ-Par6-PKC et Cdc42 y sont enrichis. Ce complexe recrute Insc qui interagit avec Pins. Pins recrute alors Mud qui interagit avec les moteurs de dynéine. Ce mécanisme permet l'orientation du fuseau mitotique.

Le complexe Gai/LGN/NuMA, peut aussi avoir une localisation symétrique par rapport à l'axe apico-basal. Dans les progéniteurs neuraux apicaux chez les vertébrés LGN/NuMA forme une ceinture latérale symétrique par rapport à l'axe apico-basal (Peyre et al., 2011) (**Figure 11**). Les forces de traction sur les microtubules permettent alors l'orientation et le maintien du fuseau mitotique de manière planaire par rapport au plan apical. Curieusement, Gai est distribuée de manière homogène au niveau du cortex cellulaire, ce qui pose la question des mécanismes restreignant LGN et NuMA à cette ceinture latérale (Peyre et al., 2011). La forme Gai-GDP pourrait n'être présente que sur les bords latéraux et le trimère Gai-G $\beta$ -G $\gamma$  ou la forme Gai-GTP localisés au niveau apical et basal du cortex des progéniteurs neuraux. Il a été montré que Ric8, une GEF échangeant le GDP en GTP sur Gai, avait un impact sur l'orientation du fuseau mitotique sur des cellules en culture (Chan et al., 2011). De plus, chez *C. elegans*, des mutants pour Ric8 *présentent aussi* une perturbation de l'orientation du fuseau mitotique (Afshar et al., 2004; Miller and Rand, 2000). La suppression de la forme Gai-GDP de certains domaines corticaux par Ric8 pourrait donc permettre de restreindre les domaines d'ancrage des microtubules astraux. En complément de cette régulation, des mécanismes participent vraisemblablement à la production de la forme Gai-GDP. Toutefois ils restent à identifier. Les protéines Gai sont connues pour leur contrôle par des récepteurs à sept segments transmembranaires. Il est donc possible que l'activité des Gai soit régulée par de tels récepteurs et donc par des signaux extracellulaires dans le contexte des divisions cellulaires obliques. L'identité de tels récepteurs couplés à des protéines Gai n'est pas connue à ce jour.

Une étude récente a mis en évidence la participation de la protéine Huntingtin (Htt) dans l'orientation du fuseau mitotique (Godin et al., 2010). Cette protéine est impliquée la maladie neuro-dégénérative de Huntington. Il a été montré que dans un situation non pathologique, la protéine Htt est localisée au niveau des pôles du fuseau mitotique pendant la mitose des progéniteurs corticaux des mammifères. Elle participerait à la localisation de NuMA et des moteurs de dynactine/dynéine. En effet, un traitement de ces progéniteurs par ARN interférent contre la Htt montre des défauts dans l'orientation du fuseau mitotique dû à une mauvaise localisation des moteurs de dynactine/dynéine et NuMA. Cette fonction est conservée chez la *Drosophile* au niveau de ses neuroblastes. D'ailleurs, la Htt de *Drosophile* a la



**Figure 11 : Positionnement du fuseau mitotique de manière planaire dans les neuroblastes d'amniotes.** Gαi/LGN/NuMA forme une ceinture corticale. Ce complexe va permettre l'orientation du fuseau mitotique de manière planaire par rapport au plan apical. Ce plan est marqué par la présence d'un pied apical formé de jonctions adhérentes et du complexe Par3-Par6-aPKC.

capacité de rétablir la bonne orientation du fuseau mitotique dans les cellules de mammifères ((Godin et al., 2010) et pour revue (Godin and Humbert, 2011)).

### *iii. La polarité cellulaire intrinsèque et l'orientation du fuseau mitotique*

La polarité de la cellule conditionne l'orientation du fuseau mitotique. Cet aspect a bien été étudié chez les invertébrés (chez *C.elegans* et la Drosophile au niveau des soies et des neuroblastes) et chez les vertébrés au niveau des neuroblastes et des progéniteurs de la peau. Nous allons évoquer quelques-uns de ces modèles d'étude.

Chez *C.elegans* nous avons vu que la cellule œuf se divise de manière asymétrique le long de l'axe antéro-postérieur. Ce processus s'effectue grâce à une polarisation asymétrique de la cellule qui engendre une traction du fuseau mitotique vers le pôle postérieur via un enrichissement de GPR1-2 (Grill et al., 2003). Quels sont les signaux qui induisent cette polarisation spécifique ? Au niveau de l'œuf, le complexe Par1-Par2 est localisé au pôle postérieur et le complexe Par3-Par6-PKC au pôle antérieur. Les travaux de O'Connell et ses collaborateurs ont montré que l'entrée du spermatozoïde au moment de la fécondation est un processus essentiel pour la polarisation de la cellule œuf. Le centrosome du spermatozoïde synthétise des microtubules astériens qui interagissent avec le cortex de la cellule et définissent le pôle postérieur et la localisation asymétrique des complexes PAR3-Par6-PKC et Par1-Par2 (Goldstein and Hird, 1996; O'Connell et al., 2000). La polarité cellulaire induite par les complexes PAR permet alors le recrutement de GPR1/2 au niveau des Gai au côté postérieur, pendant l'anaphase, c'est-à-dire lors du positionnement du fuseau mitotique (Colombo et al., 2003). GRP1/2 recrute ensuite LIN-5 associée aux moteurs de dynéines. Au niveau latéral, la protéine Let-99, une autre protéine de polarité, inhibe la localisation corticale de GPR1/2 ce qui exclut les fibres astériennes des régions latérales (Park and Rose, 2008) (**Figure 9**).

Au niveau des neuroblastes de la Drosophile, les cellules se délaminent du neuroectoderme, un tissu polarisé avec un pôle apical et basal. Elles perdent alors le contact cellulaire, changent de forme et héritent d'une certaine polarité asymétrique du tissu épithélial. Elles vont ensuite se diviser de manière asymétrique et



perpendiculairement par rapport au plan apical (rotation du fuseau mitotique de 90° par rapport aux cellules du neuroépithélium) (confère I.2.b. et pour revue voir (Wodarz and Huttner, 2003)). L'orientation du fuseau mitotique est donc strictement contrôlée, en effet, son bon positionnement est responsable de la bonne identité des cellules filles. La division du neuroblaste commence donc par l'acquisition d'une polarité (comme chez *C.elegans*) puis la formation du fuseau mitotique. Du côté apical de la cellule, nous retrouvons le complexe PAR : Bazooka (Baz) (homologue de Par3)-Par6-PKC, qui se localise en début de prophase, recruté par Cdc42 de la famille RhoGTPase (ancrée au cytosquelette cortical d'actine). Baz recrute Inscuteable (Insc) (Schober et al., 1999) qui interagit avec Pins (homologue de GPR et LGN). Côté basal, des protéines comme Miranda, Prospero et Numb y sont localisées en fin de Prophase (Shen et al., 1997). Wodarz et ses collaborateurs ont montré qu'une perte de Bazooka mène à une perturbation de l'orientation du fuseau mitotique contrairement à une perte de Par6, PKC ou des protéines basales (Wodarz et al., 1999) et peut amener à la génération de deux cellules filles identiques. En revanche, la perte de Miranda perturbe l'intégrité du tissu dû à une mauvaise acquisition d'identité par les cellules filles engendrées (Ikeshima-Kataoka et al., 1997) (**Figure 10**).

Ces deux exemples de contrôle de l'orientation du fuseau mitotique par la polarité de la cellule montrent qu'il existe des processus très conservés, comme les complexes PAR interagissant avec les protéines Gai, LGN et NuMA et permettant leur position très stéréotypée. Autant, dans les neuroblastes de *Drosophile* et chez le zygote *C.elegans*, le lien entre les protéines PAR et le recrutement de Gai/LGN/NuMA est bien établi, par contre, au niveau des progéniteurs neuraux chez les vertébrés, les mécanismes de recrutement du complexe LGN et NuMA au niveau de la ceinture latérale reste encore mal compris. Depuis quelques années beaucoup de progrès ont été faits pour mieux comprendre les mécanismes de mise en place de l'orientation du fuseau mitotique, le nombre de questions demeurent concernant l'interaction de NuMA avec les moteurs de dynéine, le recrutement de LGN au cortex de la cellule, l'activation et la stabilisation de la forme Gai-GDP...



iv. *L'implication de la voie Rho-GTPase dans l'orientation du fuseau mitotique*

Nous avons vu dans le paragraphe précédent, l'implication des petites protéines G hétérotrimériques (comme G $\alpha$ i), dans l'orientation du fuseau mitotique de différents organismes et tissus. D'autres petites protéines G ont été impliquées dans la mise en place de l'orientation du fuseau mitotique. C'est le cas des protéines de la famille RhoGTPase, comme RhoA et Cdc42. Les Rho-GTPases sont connues dans leur action sur l'organisation du cytosquelette d'actine. Elles alternent entre deux formes : une active, Rho-GTP et une inactive, Rho-GDP. Les GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) les activent en changeant le GDP avec un GTP et les GAP (GTPase Activating Protein) les inactivent en hydrolysant le GTP en GDP. Une étude récente montre que si l'on diminue l'activité de RhoA dans le neuroépithélium de poulet à l'aide un dominant négatif, l'orientation du fuseau mitotique est perturbée (Roszko et al., 2006). Plusieurs mécanismes peuvent expliquer ce phénomène. D'une part, il a été montré que RhoA joue un rôle important dans l'établissement de la polarité cellulaire. Chez la Drosophile, un effecteur en aval de RhoA, la Myosine II non musculaire, est requise pour polariser dans les neuroblastes Numb et Propero au pôle basal et le complexe G $\alpha$ i/Pins/Mud au pôle apical (Barros et al., 2003). Les travaux de Katayama et ses collaborateurs montrent chez la souris, qu'une ablation de RhoA par la génération de mutants conditionnels RhoA dans les progéniteurs neuraux perturbe la maintenance des jonctions adhérentes du pied apical, comme l' $\alpha$ E-Caténine, un élément clé de la polarité du progéniteur neural chez les amniotes (Katayama et al., 2011). Les jonctions adhérentes étant cruciales à la structure du pied apical et au maintien de la polarité apico-basale de la cellule, la cellule perd sa polarité intrinsèque et se désorganise si celles-ci sont altérées. Cette désorganisation intrinsèque peut mener à une altération de l'orientation du fuseau mitotique

D'autre part, les effets de RhoA sur l'orientation du fuseau mitotique pourraient passer par le contrôle du cytosquelette cortical d'actine. Les effets de RhoA sur le remodelage du cytosquelette d'actine a été particulièrement étudié dans des contextes comme la migration cellulaire ou axonale. Une voie de signalisation impliquant RhoA, les kinases Rock, LIMK et la cofilin a été mise en évidence dans ce





**Figure 12 : Voie ROCK/LIMKinase/Cofiline.** ROCK active la LIMKinase par phosphorylation, qui inhibe ensuite l'activité de la Cofiline donc la dépolymérisation de l'actine. Une perturbation de l'activité de la LIM-Kinase se traduit par une localisation de la Cofiline non phosphorylée dans le cortex de la cellule pendant la mitose ce qui a pour conséquence de déstabiliser l'organisation du réseau d'actine et de perturber l'orientation du fuseau mitotique. En vert LGN-GFP.

contexte. De manière intéressante, les membres de cette voie ont aussi été impliqués dans le contrôle de l'orientation des divisions.

Rock est activée par RhoA. Chakrabarti *et al.* ont montré dans des cellules HeLa que ROCK régule l'activité catalytique de la LIM-kinase (LIMK) par phosphorylation de celle-ci pendant la Prophase. Non phosphorylée, la LIM-Kinase est localisée dans le cytoplasme de la cellule, sous forme phosphorylée, elle est recrutée par les  $\gamma$ -tubulines des centrosomes, et ce à partir de la Prophase et jusqu'à la fin de la mitose (Chakrabarti *et al.*, 2007). La LIM-Kinase phosphoryle la Cofiline ce qui a pour conséquence d'inhiber son activité de remodelage du cytosquelette d'actine. La Cofiline a en effet pour rôle de maintenir le pool de monomères de F-actine dans le cytoplasme de la cellule. Son inhibition pendant la mitose garantit la stabilité de l'actine corticale pendant cette étape. Une perturbation de l'activité de la LIM-Kinase se traduit par une localisation de la Cofiline non phosphorylée dans le cortex de la cellule pendant la mitose ce qui a pour conséquence de déstabiliser l'organisation du réseau d'actine (**Figure 12**). Ces défauts se répercutent sur l'organisation des microtubules astraux et sur l'orientation du fuseau mitotique.

En quoi le fait de perturber le cytosquelette d'actine perturbe l'orientation du fuseau mitotique ? Une organisation particulière du cytosquelette d'actine à l'aplomb des centrosomes et des points d'ancrage des microtubules astraux est-elle nécessaire à une bonne orientation du fuseau mitotique ? Les travaux de Kaji *et al.* montrent une accumulation marquée de P-Cofiline au niveau des centrosomes ainsi qu'au niveau du cortex de la cellule, au niveau des sites d'ancrage des microtubules (Kaji *et al.*, 2008). Nous pouvons émettre l'hypothèse que la composition ou la densité du cytosquelette varie en fonction du domaine apical, latéral ou basal considéré et que certains domaines d'actine présentent des affinités ou des compositions plus propices à l'accroche des fibres astrales (via les effecteur Gai, LGN et NuMA par exemple).

Cdc42, un autre membre de la famille des Rho-GTPases, est impliqué dans le positionnement du fuseau mitotique dans de nombreux contextes cellulaires. Cdc42 est impliqué dans la définition de l'axe antéropostérieur chez *C.elegans* et dans le contrôle de l'orientation du fuseau mitotique de la première division du zygote, de l'embryon de souris et de Xénope (Bement *et al.*, 2005; Gonczy and Rose, 2005;



Gotta et al., 2001; Na and Zernicka-Goetz, 2006). De plus, il est impliqué dans le positionnement du fuseau mitotique des cellules neuroépithéliales chez le Xénope pendant la fermeture du tube neural (Kieserman and Wallingford, 2009). Kieserman et Wallingford ont développé une technique de vidéo microscopie afin d'observer la fermeture du tube neural *in vivo* en 3 dimensions. Pour cela, ils ont tout d'abord micro injecté les embryons de Xénope au stade 4 cellule avec des ARNm fluorescents codant pour des protéines fusion. Au stade neural, les embryons sont immobilisés grâce à de l'agarose puis scanner au confocal toutes les 30-60 secondes. Pendant la Métaphase, comme c'est le cas au niveau des progéniteurs neuraux des amniotes, le fuseau mitotique effectue des rotations aléatoires puis il se fixe en position médiolatérale dans le plan de l'épithélium. Quand Cdc42 est altéré, par injection de Cdc42-N17, bloquant l'activité GTPase de Cdc42 (son habilité à échanger le GDP en GTP) le fuseau mitotique effectue des rotations excessives et l'orientation finale des divisions cellulaires est perturbée (Kieserman and Wallingford, 2009).

**b. Les mécanismes extrinsèques qui participent à la régulation du fuseau mitotique.**

L'étude des mécanismes qui régulent l'orientation du fuseau mitotique s'est essentiellement portée sur les mécanismes intrinsèques. Cependant, la mise en évidence d'une influence de facteurs extrinsèques sur l'orientation du fuseau mitotique a été faite il y a plus de 100 ans avec les travaux de Hertwig, O. en 1884. Ces travaux avaient montré que l'application de forces mécaniques sur un embryon d'oursin menait à des modifications de la forme des cellules et à une perturbation de l'orientation de leur fuseau mitotique. Ici, une question se pose aujourd'hui des liens entre l'environnement et la machinerie d'orientation du fuseau mitotique.



*i. L'environnement extracellulaire et la forme de la cellule agissent sur l'orientation du fuseau mitotique*

Les travaux de Hertwig, O. en 1884 ont montré que si l'on perturbe la forme d'une cellule de manière artificielle avec des forces extérieures, l'orientation du fuseau mitotique est perturbée : il se réoriente le long du plus grand axe de la cellule, là où il existe le moins de tensions. C'est un processus microtubule-dépendent observé aussi en culture dans des lignées cellulaires d'épiderme de rat (O'Connell and Wang, 2000). Les travaux de Fink et collaborateurs ont réalisé des tensions de manière artificielle qui miment l'effet de la matrice extracellulaire environnant la cellule. En effet, les forces extérieures exercées par la matrice extracellulaire interviennent dans l'orientation du fuseau mitotique en contrôlant la distribution corticale de l'actine et de ces protéines associées. Ensuite, les différentes tensions générées par l'actine et ces partenaires induisent une polarisation de la cellule et établissent des forces de traction sur les microtubules astériens (Fink et al., 2011). En fonction de la structure de la matrice extracellulaire servant de substrat d'adhérence, peut faire varier l'orientation du fuseau mitotique (Thery et al., 2007). Le patron d'adhérence cellulaire, et son couplage au cytosquelette d'actine sont donc déterminants dans l'orientation du fuseau mitotique. Ceci permettrait aux cellules intégrées dans un tissu d'aligner leurs cellules filles en fonction d'un champ de forces extérieures.

Les tensions extracellulaires provenant des adhésions cellule/cellule peuvent aussi influencer ce processus. Les interactions cellulaires via l'E-cadhérines au sein des épithéliums en sont un bon exemple. Chez le poisson zèbre, lorsque l'expression de l'E-cadhérine est perturbée, l'orientation des divisions médio-latérale des progéniteurs neuraux l'est également, ce qui a pour conséquence d'altérer la morphogénèse du tissu (Zigman et al., 2011). Le knock down l'E-cadhérine par ARN interférents contre dans des cellules MDCK, aussi altère l'orientation du fuseau mitotique (den Elzen et al., 2009). Ces résultats montrent que l'environnement cellulaire contribue à l'orientation des divisions cellulaires.



*ii. Les voies de la polarité planaire : lien entre les signaux extrinsèques et intrinsèques*

Les voies de la polarité planaire (PCP pour Planar Cell Polarity) coordonnent la polarisation intrinsèque des cellules dans le plan du tissu. Ce processus permet aux cellules intégrées dans un tissu d'acquies une orientation commune au sein de ce tissu, ou de migrer ensemble dans une direction donnée. Les voies de la PCP sont impliquées dans de nombreux processus et leur perturbation génèrent par exemple des défauts cardiaques, rénaux, du développement du tube neural ou d'orientation des cils de l'oreille interne (Simons and Mlodzik, 2008; Wang and Nathans, 2007). Ces voies de signalisation ont été initialement identifiées chez la Drosophile, elles établissent une polarité épithéliale en contrôlant la distribution d'une combinaison de signaux directionnels le long d'un axe de polarité particulier, (Tree et al., 2002; Zallen, 2007). Un ligand, sécrété en gradient le long d'un axe au sein d'un tissu, permet la polarisation des cellules en fonction du gradient. Toutes les cellules du tissu se retrouvent polarisées et orientées de la même manière. En modulant ces polarités cellulaires, les voies de la PCP impliquent des facteurs extrinsèques qui participent au positionnement du fuseau mitotique. Ces voies de la PCP sont conservées entre les invertébrés et les vertébrés et sont retrouvées dans la polarisation d'autres tissus que les épithéliums, comme les ailes et les organes précurseurs sensoriels de Drosophile, l'épiplaste chez le poisson zèbre en gastrulation, l'épiderme de souris...

Il existe deux types de voies régulant la polarité planaire : les voies impliquant les ligands Wnt et leurs récepteurs Frizzled (Fz) et celles des ligands Dachsous (Ds) et leurs récepteurs Fat (Ft). La voie Wnt/Fz est impliquée dans la polarisation des précurseurs d'organes sensoriels (SOP) de la Drosophile le long de l'axe antéro-postérieur. Fz est localisé au niveau du cortex apical postérieur. Fz est couplé à une protéine cytoplasmique Dishvelled (Dsh) capable d'interagir avec Mud (l'homologue de Numa). Ainsi la localisation de Fz et Dsh au pôle postérieur définit un premier site d'ancrage des microtubules astraux (Segalen et al., 2010).. Une altération de l'expression de Dsh (facteur activé par Fz), par la génération de Drosophile Knockout pour Dsh, conduit à une orientation du fuseau mitotique aléatoire dans l'axe antéro-postérieur (Bellaiche et al., 2004; Lu et al., 1999).





Parallèlement, deux protéines Strabismus et Prickle sont localisées au niveau antérieur de la cellule grâce aux mécanismes de polarité planaire. Ces protéines permettent la localisation de Pins au niveau antérieur, lequel recrute Numa. Ainsi, un deuxième site d'attachement des microtubules astraux est mis en place. (Bellaïche et al., 2004). Ces deux sites d'ancrage orientent ainsi le fuseau selon l'axe antéro-postérieur.

La voie Wnt-Fz est aussi impliquée dans la mise en place de l'axe Animal-Végétal dans l'embryon du poisson zèbre. Aussi, les cellules dorsales de l'épiblaste de l'embryon se divisent préférentiellement dans cet axe pendant la gastrulation. Les travaux de Gong *et al.* montrent qu'une perturbation de l'expression de la protéine Fz7, le récepteur de Wnt11, suite à une injection de morpholino, provoque une désorientation de ces divisions cellulaires, ce qui perturbe l'élongation du tissu (Gong et al., 2004; Quesada-Hernandez et al., 2010).

La voie Ft-Ds est requise pour l'orientation des divisions pendant le développement des ailes de la Drosophile, dans l'axe proximo-distal (Baena-Lopez et al., 2005). Dans ce système, Ds est exprimé en gradient le long de l'axe proximo-distal. Il induit via l'activation de son récepteur Ft, la localisation de la myosine Dachs (D) au côté distal des cellules. Ceci est nécessaire à l'orientation des divisions de manière planaire dans l'axe proximal-distal (Rogulja et al., 2008). Les cellules qui normalement s'étendent sur cet axe grâce à leur forme allongée possèdent une forme arrondie si l'expression de Ft ou Ds est altérée (le même phénotype est observé si l'une des deux molécule est exprimée de manière ectopique) (Li et al., 2009). Le rôle de la voie Ft/Ds dans l'orientation des divisions est conservé chez les vertébrés, par exemple pendant le développement du rein chez la souris où les cellules se divisent dans l'axe d'élongation des tubules rénaux (Fischer et al., 2006). L'altération de l'expression de Ft désoriente les divisions ce qui conduit à la formation de tubules anormalement larges (Saburi et al., 2008).

La voie de polarité planaire Wnt-Fz est aussi cruciale dans l'orientation des divisions des progéniteurs neuraux chez les mammifères. Un mutant de la protéine Vangl2 homologue de strabismus présente une réduction du pourcentage de division



oblique dans le cortex (Lake and Sokol, 2009). L'origine des signaux extracellulaires contrôlant cette voie reste à être élucidée.

Ces exemples montrent comment les voies de la PCP régulent l'élongation des tissus dans un axe particulier via la régulation de l'orientation du fuseau mitotique. Elles participent ainsi à la morphogénèse des tissus (pour revue voir (Zallen, 2007).

Une autre influence extracellulaire est celle médiée par le facteur LPA pour Lysophosphatidic acid, un phospholipide ayant des propriétés de signalisation extracellulaire via son récepteur LPAR couplé aux protéines G (Anliker and Chun, 2004). LPA a été impliqué dans la neurogénèse corticale (Hecht et al., 1996). L'altération de l'expression de LPAR conduit à des défauts de prolifération des progéniteurs neuraux du cortex : Estivill-Torrùs *et al.* observent dans leur étude une réduction de la population des progéniteurs neuraux, des divisions différenciatives précoces ainsi qu'une augmentation de l'apoptose ce qui conduit à une diminution de la taille du cortex. Il est intéressant de noter que ces défauts de prolifération sont accompagnés d'altérations des angles de division des progéniteurs (Estivill-Torrus et al., 2008). Les auteurs observent une augmentation du nombre de divisions obliques, Ce facteur LPA est intéressant dans le fait que son récepteur est associé aux protéines G. Il pourrait donc être impliqué dans l'activation ou la localisation de Gai-GDP.

#### **4. Conclusion**

En conclusion de cette partie sur la composition, la mise en place, le rôle et le contrôle de l'orientation du fuseau mitotique, le fuseau mitotique est une structure très dynamique et son contrôle joue un rôle dans de nombreux contextes de développement. De nombreuses recherches sur le contrôle de son orientation ont été menées dans des modèles très diversifiés. Cependant, de nombreuses questions sont encore sans réponse. Comment NuMa interagit et active les moteurs de dynéines ? Existe-il des facteurs extrinsèques qui permettent d'orienter le fuseau mitotique des progéniteurs neuraux ? Les mécanismes extrinsèques mis en évidence



(comme les voie de la polarité planaire ou l'environnement extracellulaire) contrôlent indirectement l'orientation de l'axe de division via la mise en place de la polarité intrinsèque de la cellule. Nous pouvons nous demander s'il existe des facteurs qui contrôlent plus directement l'orientation des divisions. De plus, nous pouvons nous demander aussi si la cellule a besoin de positionner finement son axe de division dans l'espace par rapport à un axe particulier. En effet tous les exemples discutés ne parlent que de divisions planaires et obliques sans parler de coordonnées précises. Il a été pourtant été proposé dans le neuroépithélium de mammifère, que de petites variations de l'angle de division des progéniteurs neuraux peuvent avoir des conséquences sur la neurogénèse. En effet, étant donné que le partage de l'étroit pied apical entre les deux cellules filles est déterminant pour le maintien de son ancrage apical, il est nécessaire que la cellule puisse finement positionner son axe de division via son fuseau mitotique par rapport à ce pied apical. (Kosodo et al., 2004). De plus, nous avons observé que les divisions obliques présentent des degrés de déviation variable. Nous pouvons nous demander si la diversité de ces angles obliques joue un rôle dans le développement et si elle est l'objet d'un contrôle fin.

Existe-il des mécanismes qui orientent de manière précise les fuseaux mitotiques ? Sont-ils intrinsèques à la cellule ? Peut-on imaginer que des signaux extrinsèques contrôlent directement l'orientation de l'axe de division en donnant une information de position, un repère spatial et topographique à la cellule en division pour positionner finement leur axe de division dans les plans d'un tissu ? Durant ma thèse, je me suis intéressée à ces questions. Pour y répondre, j'ai utilisé le modèle des progéniteurs neuraux de la moelle épinière de souris au stade embryonnaire E10.5 (début de la phase de neurogénèse). Nous allons donc introduire plusieurs aspects du développement et de la neurogenèse dans la moelle épinière des vertébrés.



## **II. LE DEVELOPPEMENT DU TUBE NEURAL ET LA NEUROGENESE PRIMAIRE DE LA MOELLE EPINIÈRE CHEZ LES VERTEBRES**

La moelle épinière constitue la région la plus postérieure du système nerveux central. Composée de circuits connectant divers types de neurones (motoneurones, interneurones) et de cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes), la moelle épinière est cruciale dans le contrôle sensori-moteur. Elle relaie aussi des informations nerveuses issues du cerveau. Comme tout le système nerveux central, la moelle épinière se développe à partir d'un tube neural mis en place au cours de la neurulation et dans lequel un programme de développement complexe s'effectue. Il met en jeu entre autres des étapes de prolifération, patterning, différenciation et formation de connections neurales. Au fur et à mesure du développement, le tube neural se régionalise en multiples territoires selon l'axe dorso-ventral et antéropostérieur. Dans chaque territoire, le programme de développement se décline avec une variante spécifique lui conférant une structure, une connectivité et une fonction particulière. Le nombre de neurones générés, qui varie d'une région à l'autre, est un paramètre important de la physiologie du système nerveux.

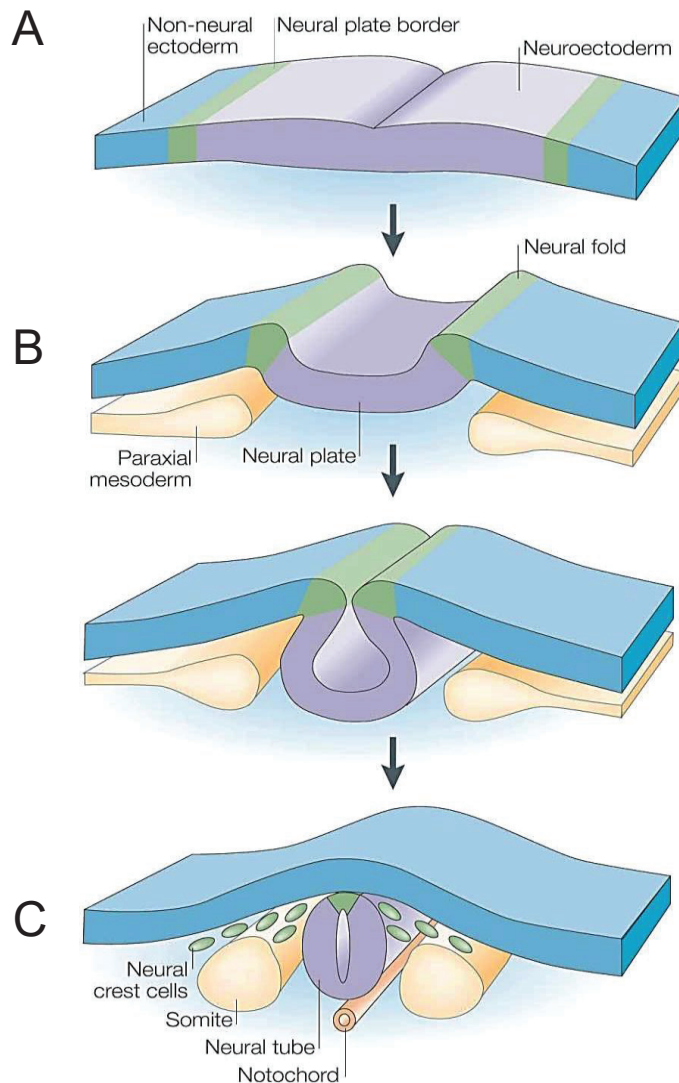
Dans ce chapitre, après un rappel des étapes précoces d'organogenèse de la moelle épinière, nous nous concentrerons sur les mécanismes qui participent à la neurogenèse et en particulier, la place de l'orientation des divisions cellulaires pendant cette étape.

### **1. Mise en place du tube neural et régionalisation de la moelle épinière chez les vertébrés**

#### **a. Induction neurale et Neurulation**

Le système nerveux central dérive d'un territoire dorsal de l'ectoderme appelé neuroectoderme. Ce territoire (spécifié grâce à des signaux issus du mésoderme dorsal) se distingue du reste de l'épithélium ectodermique par un épaissement dû à un allongement des cellules dans l'axe apicobasal. Ceci lui donne une structure





**Figure 13 : La formation du tube neural chez les vertébrés. A)** Induction de la plaque neurale : des signaux provenant du mésoderme et de l'ectoderme induisent les cellules du neuroectoderme à s'épaissir et s'intercaler pour former la plaque neurale. Elle est constituée de deux zones : la plaque neurale centrale et ses bords latéraux (un peu plus fins). **B)** Formation des bourrelets neuraux par invagination de la plaque neurale, soulèvement de la zone latérale et allongement de l'ectoderme. La plaque neurale se replie sur elle-même grâce aux nombreux mouvements cellulaires stéréotypés pour former le tube neural. **C)** Fermeture et isolation du tube neural. Les bourrelets neuraux se rejoignent et fusionnent autour du canal épendymaire.

d'épithélium pseudostratifié ou neuroépithélium (Schoenwolf et al., 1989). Chez la souris, au stade embryonnaire E7.5, la plaque neurale subit une invagination grâce à la déformation des cellules : remodelage du cytosquelette (allongement du corps basal et contraction apicale des cellules par contraction des microfilaments d'actine) (Schoenwolf and Franks, 1984), division cellulaire dans des orientations particulières, mouvements cellulaires (extension, convergence, intercalation) ainsi que des modifications de l'adhésion cellulaire (Schoenwolf and Alvarez, 1989). Tous ces processus génèrent des forces latérales (Alvarez and Schoenwolf, 1992; Lawson et al., 2001a). Ainsi, l'ectoderme latéral se plie, se soulève puis forme les bourrelets neuraux. La plaque neurale se convertit alors en gouttière neurale (Lawson et al., 2001b) et (Schoenwolf, 1988) (**Figure 13 A et B**). La gouttière neurale obtenue se referme dorsalement : les deux bourrelets neuraux se rejoignent puis fusionnent au niveau de la ligne médiane dorsale de l'embryon, les cellules situées à l'interface ectoderme/neuro-ectoderme forme la plaque du toit. Cette soudure se réalise autour d'une lumière centrale : le canal épendymaire dans lequel circulera le liquide céphalorachidien. Il en résulte alors un tube composé de cellules organisées et polarisées selon l'axe apicobasal. C'est le processus de la neurulation (**Figure 13 C**).

## **b. Régionalisation de la moelle épinière**

Une fois formé et fermé, le neuroépithélium du tube neural n'est constitué que d'une couche de cellules neurales indifférenciées appelées cellules progénitrices neurales. Elles constituent la Zone Ventriculaire (ZV) de la moelle épinière. Ces cellules vont acquérir progressivement un destin spécifique en fonction de leur position par rapport à l'axe dorso-ventral et antéro-postérieur. En effet, selon leur position spatiale, ces cellules reçoivent différentes combinaisons de signaux qui les spécifient en un type cellulaire particulier. Les différents types de neurones sont issus de groupes spécifiques de progéniteurs neurales suivant des programmes transcriptionnels particuliers leur permettant d'acquérir leur identité et connectivité spécifiques. Le destin du progéniteur dépend donc de sa position initiale et de la période pendant laquelle il se différencie. Ce processus relève de la régionalisation ou « patterning » en anglais.



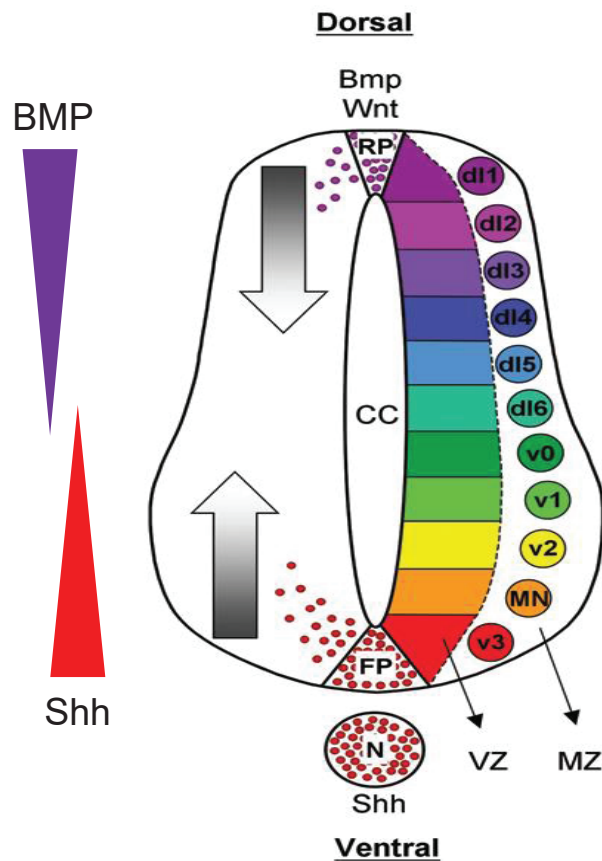
### *i. La régionalisation antéropostérieure*

Le tube neural antérieur se subdivise en trois puis cinq vésicules (télencéphale, diencéphale, mésencéphale, métencéphale et myélocéphale) qui préfigurent le cerveau. Le tube neural postérieur forme la moelle épinière. Des morphogènes comme FGF, Wnt ou l'Acide rétinoïque contrôlent l'expression de gènes homéotiques (Hox) selon un patron segmentaire dans la moelle épinière. Puis ces gènes Hox contrôlent la régionalisation antéropostérieure de la moelle épinière : cervicale, brachiale, thoracique, lombaire et sacrée, et complètent la combinatoire des morphogènes définissant des limites rostro-caudales.

### *ii. La régionalisation dorso-ventrale*

D'autres morphogènes contrôlent la régionalisation de la moelle épinière dans l'axe dorso-ventral. Ils proviennent de deux sources : l'ectoderme sus-jacent au tube neural, qui délivre des signaux dorsalisants et la corde, sous-jacente au tube neural délivrant des signaux ventralisants. La notochorde sécrète un facteur : Sonic hedgehog (Shh) (Filosa et al., 1997). La partie la plus ventrale du tube neural, recevant une forte concentration de Shh, se différencie en une structure médiane organisatrice appelée la plaque du plancher. Cette plaque sécrète à son tour Shh au niveau du tube neural (Marti et al., 1995) (confère Introduction générale, 2.b.ii.). Un gradient dorso-ventral de Shh se forme dans le tube neural et active une combinaison de facteurs de transcription incluant des protéines à Homéodomaine.

Côté dorsal, le tube neural reçoit, de l'ectoderme sus-jacent, des signaux sécrétés comme BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4). Elle est ensuite exprimée par la plaque du toit avec les protéines Wnt (Helms and Johnson, 2003). L'action croisée des voies de signalisation Shh et BMP/Wnt permet l'expression de combinaisons spécifiques de facteurs de transcription dans les progéniteurs neuraux le long de l'axe dorso-ventral de la moelle épinière. Ils assurent alors l'apparition de onze domaines de progéniteurs qui généreront un type neural particulier, par exemple, côté ventral les motoneurones et les interneurones ventraux (pour revue,



D'après Ulloa *et al.* 2007

**Figure 14 : La régionalisation dorso-ventrale de la moelle épinière.** Shh est sécrété par la plaque du plancher et BMP/Wnt par la plaque du toit. Leur sécrétion crée un gradient le long de l'axe dorso-ventral et permet l'expression de combinaisons spécifiques de facteurs de transcription dans les progéniteurs neuraux le long de cet axe. Ils assurent alors l'apparition de onze domaines de progéniteurs qui génèreront un type neural particulier dont les motoneurones (MN) les interneurons dorsaux et ventraux.

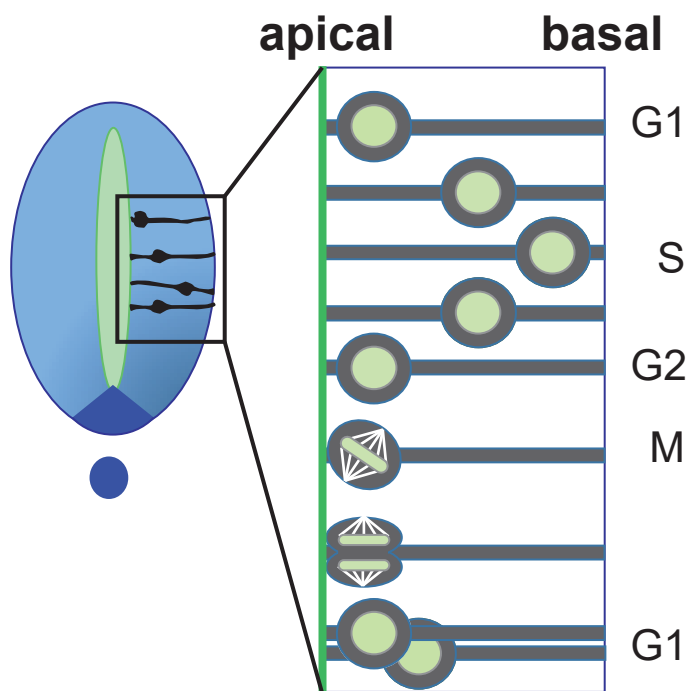
voir (Briscoe and Ericson, 2001; Lupo et al., 2006)) et côté dorsal, les interneurons dorsaux (Briscoe et al., 2000; Helms and Johnson, 2003; Lee et al., 1998) (**Figure 14**). Nous allons nous intéresser dans la partie suivante, aux principaux mécanismes contribuant à la naissance des neurones.

## **2. La neurogénèse primaire de la moelle épinière**

Suite à cette période de formation du tube neural et de régionalisation, une phase de prolifération des progéniteurs neuraux de la ZV se met en place. Elle permet ainsi une augmentation du nombre de progéniteurs et par conséquent de la surface du tube neural. A partir du stade E9.5 chez la souris, commence une période de production intense des neurones allant jusqu'au stade E13 dans la moelle épinière et s'étalant jusqu'au stade E18.5 dans le cortex cérébral. C'est l'étape de neurogénèse primaire, qui met en place la grande majorité des neurones présents à la naissance et chez l'adulte.

### **a. Dynamique des progéniteurs neuraux dans la Zone Ventriculaire de la moelle épinière**

Au sein de la ZV, les progéniteurs effectuent des cycles cellulaires. Nous avons rapidement évoqué dans la partie précédente l'organisation des progéniteurs neuraux dans la ZV du tube neural. Ce sont des cellules ayant des caractéristiques épithéliales : elles sont polarisées le long de leur axe apico-basal et possèdent un attachement à la surface apicale : le pied apical et une fibre basale connectée à la surface basale. Cette organisation a été observée par F. Sauer dans les années 1930. A l'intérieur de la ZV, les progéniteurs prolifèrent et se différencient et nous pouvons observer un mouvement nucléaire corrélé aux phases de leur cycle cellulaire. Ce mouvement est appelé mouvement interkinétique observé par M.E. Sauer en 1959 grâce à des marquages à la Thymidine-<sup>3</sup>H (Sauer and Chittenden, 1959) (**Figure 15**). Ce processus donne au tissu neuroépithélial sa structure pseudostratifiée. La phase S du cycle cellulaire se réalise au pôle basal, et la Mitose au pôle apical. Pendant les phases G1 et G2, le noyau migre entre ces deux pôles. A



**Figure 15: Mouvement interkinétique des cellules neuroépithéliales chez les vertébrés.** A l'intérieur du tube neural, les cellules progénitrices sont polarisées et possèdent un ancrage apical et basal. Pendant le cycle cellulaire, leur noyau effectue des oscillations entre ces deux pôles appelées mouvement interkinétique. Ce qui permet à la Mitose de se réaliser au pôle apical, au bord du canal épendymaire. Ce processus permet de conserver l'intégrité du tissu pseudostratifié.

l'issue de la mitose, la cellule mère peut donner naissance soit à deux progéniteurs (division proliférative, symétrique), soit à un progéniteur et un neurone (division différenciative, asymétrique) soit à deux neurones (division neurogénique terminale, symétrique).

Dans la moelle épinière, les progéniteurs vont rester au niveau de la ZV. En revanche, les cellules filles destinées à devenir un neurone vont sortir du cycle cellulaire en G0, ainsi devenant post-mitotiques. Elles décrochent alors leur ancrage apical, migrent vers le côté basal ou elles s'accumulent formant ainsi le manteau de la moelle épinière. Ces cellules post-mitotiques se différencient par la suite en neurones.

Ainsi, du choix du type de division effectué par le progéniteur neural dépend le nombre final de neurones générés. Le contrôle de la balance entre ces trois modes de division est donc un aspect crucial du développement du système nerveux. Nous présenterons des résultats et modèles sur les mécanismes contribuant au choix du mode de division des progéniteurs et au déterminisme du destin de leurs cellules filles.

## **b. Les principales voies de signalisation et mécanisme qui génèrent des neurones**

### *i. Les facteurs proneuraux, la voie Delta/Notch et le destin neuronal*

Comme beaucoup d'évènements développementaux, la neurogénèse est régulée par une balance entre des régulateurs positifs qui la promeuvent et des régulateurs négatifs qui la contraignent et dictent quand et où elle doit avoir lieu. La transition entre la prolifération et la différenciation est contrôlée de façon antagoniste par deux groupes de gènes codant pour des facteurs de transcription à motif hélice-boucle-hélice (HLH) se fixant à l'ADN : les HLH pro-neuraux qui favorisent la différenciation neurale et les HLH anti-neuraux qui inhibent les HLH pro-neuraux ((Murre et al., 1989) et pour revue voir (Bertrand et al., 2002)).

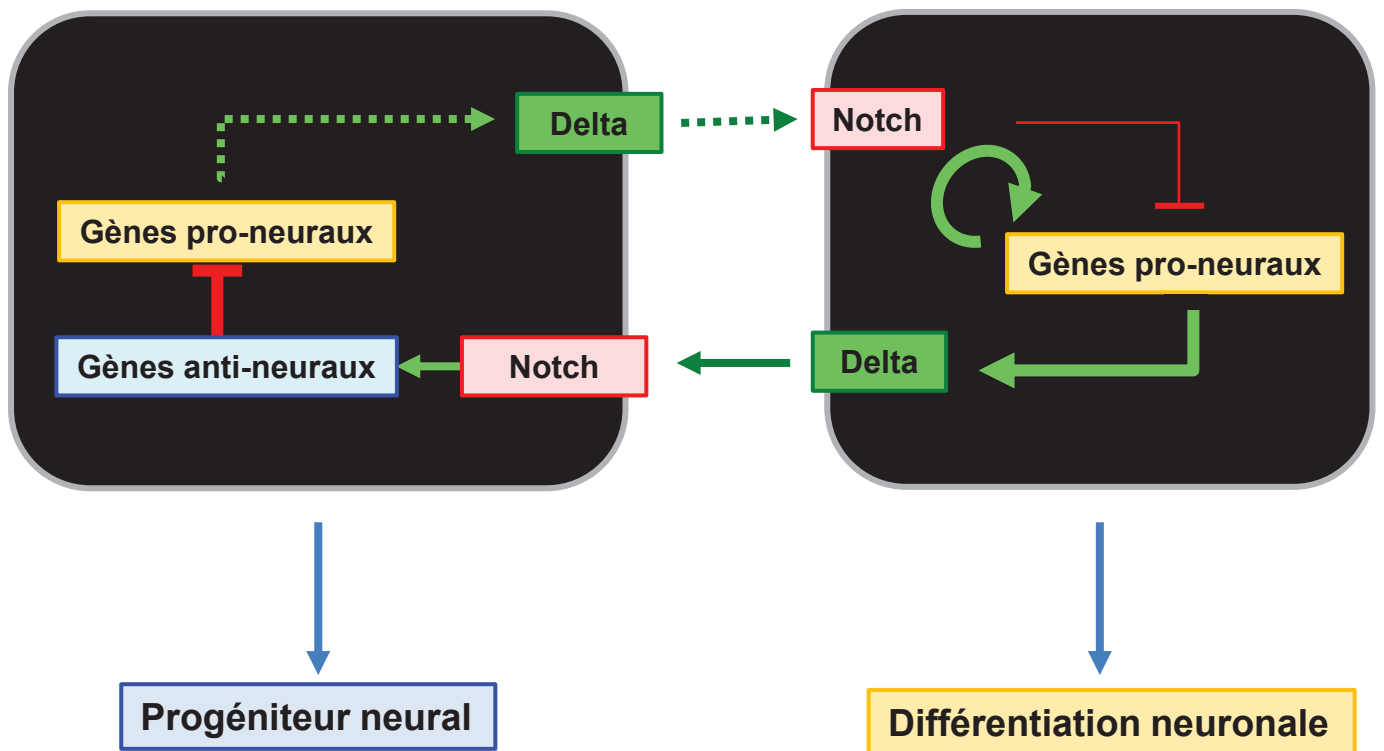




Ces gènes ont été mis en évidence chez la Drosophile et sont conservés chez les vertébrés. Des gènes pro-neuraux sont exprimés à bas niveau dans les progéniteurs (Cubas et al., 1991) (*achaete (ac)*, *scute (sc)*) chez la Drosophile ; *mash1*, *neurogenine1/2 (ngn1/2)* chez la souris (Lee et al., 1995; Roztocil et al., 1997)). Les produits des gènes pro-neuraux sont nécessaires et suffisants pour initier le développement du lignage neuronal et pour permettre la génération de progéniteurs engagés dans la différenciation (Jimenez and Modolell, 1993). Par exemple, une surexpression de Ngn1/2 ou Mash1 provoque une production prématurée des neurones et une déplétion du réservoir de progéniteurs neuraux (Farah et al., 2000; Ma et al., 1996). De plus, une surexpression de Ngn1 dans des progéniteurs neuraux en culture conduit ces cellules à ne se différencier qu'en neurone (et non en neurone et cellules gliales) (Sun et al., 2001). Inversement, l'inactivation de ces gènes conduit à une diminution du nombre de neurones et à un engagement des progéniteurs vers un destin glial (Nieto et al., 2001). Les gènes bHLH proneuraux sont des gènes maîtres de la différenciation des progéniteurs en neurone. D'autres protéines bHLH à l'inverse, maintiennent le progéniteur sous sa forme proliférative. C'est le cas des gènes anti-neuraux *Enhancer of split (E(spl))* chez la Drosophile et *hes* chez la souris (Davis and Turner, 2001): une perturbation de *hes1* par exemple cause une différenciation neurale précoce (Lo et al., 1998) (Farah et al., 2000) alors que sa surexpression peut inhiber la neurogénèse (Ishibashi et al., 1994). L'équilibre d'expression entre ces gènes régule les étapes de la différenciation neurale et donc le nombre de neurones généré. Comment cet équilibre est-il régulé ?

Les produits des gènes pro-neuraux ont la propriété d'inhiber leur propre expression dans les cellules adjacentes par activation des gènes anti-neuraux., Mash/Ngn exprimé dans une cellule va induire l'expression de gènes Hes dans les cellules voisines, lesquels inhibent l'expression Mash/Ngn. C'est le processus de l'inhibition latérale. A travers des interactions cellule/cellule, une première cellule qui s'engage dans les voies de différenciation en informe ces voisines. Elle leur transmet un signal inducteur de l'expression de gènes anti-neuraux qui va y inhiber le destin neural. Le processus d'inhibition latérale implique la voie de signalisation Delta/Notch (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Dans une cellule, l'activation de Notch par son ligand Delta (ou DLL1 chez les vertébrés) induit l'expression des gènes anti-

## Progéniteurs neuraux voisins



D'après Bertrand and Diogo *et al.* 2002

**Figure 16 : La voie delta/Notch et le processus de l'inhibition latérale.** Delta exprimé par un progéniteur active Notch au niveau de la cellule voisine. Notch y active l'expression de gènes anti-neuraux inhibant l'expression des gènes pro-neuraux. Le progéniteur conserve son état prolifératif. Au niveau de la cellule qui exprime Delta, les gènes pro-neuraux ne sont pas inhibés par Notch se qui permet à la cellule de rentrer dans les voies de la différenciation.

neuraux dont le produit inhibe directement l'expression des gènes pro-neuraux. L'expression des gènes pro-neuraux, exprimés à faible niveau de manière équivalente dans un groupe de cellule, est donc redéfinie à un nombre restreint de cellules grâce à l'inhibition latérale (Chitnis and Kintner, 1996; Lewis, 1998) (**Figure 16**). L'activité de Notch étant passagère, les gènes pro-neuraux ne sont pas constamment inhibés. Ce mécanisme permet aux progéniteurs d'acquérir une identité et d'adopter un destin cellulaire différent en fonction de la période d'expression des gènes pro-neuraux et de leur nature (Perron and Harris, 2000).

Comment est activée la signalisation Notch dans un groupe restreint de cellule ? L'activation de Notch est dose dépendante ; elle est donc activée dans une cellule quand une de ses voisines exprime à haut niveau son ligand Delta (Culi and Modolell, 1998 ; Skeath and Carroll, 1992). L'expression de Delta étant activée par les gènes pro-neuraux, la cellule destinée à devenir neurone exprime alors à haut niveau Delta, activant Notch chez ses voisines, destinées à rester progéniteur (Artavanis-Tsakonas et al., 1990) (**Figure 16**). Le processus de l'inhibition latérale est fondamental pour la sélection des précurseurs neuronaux.

Ainsi, la signalisation Delta/Notch permet de limiter le nombre de cellules qui quittent leur cycle cellulaire pour se différencier et participe au contrôle du nombre de neurones générés. Nous pouvons supposer qu'elle permet de répartir de manière homogène les sites de naissance des neurones le long de la ZV. D'autre part, elle permet d'étaler dans le temps la naissance des neurones et à contribuer à générer des types neuronaux différents dans le temps (Nieto et al., 2001).

De nombreuses questions sont encore soulevées, notamment quand entre en jeu cette signalisation ; avant ou après la mitose? Est ce une interaction entre les cellules filles seules ou avec les progéniteurs voisins ? Il a été constaté une expression oscillante en opposition de phase entre Hes1/5 et Mash/Ngn dans les progéniteurs cyclants (Shimojo et al., 2008) ; est ce que la voie Delta/Notch détermine avant la division le futur produit d'un progéniteur ?



## ii. *L'hypothèse de l'héritage de déterminants cytoplasmiques du destin*

De nombreux cas de spécification cellulaire sont basés sur la présence de déterminants du destin polarisés dans le cytoplasme de la cellule mère. Lors de la division cellulaire si le partage de ces déterminants est égal, les cellules filles adoptent un destin similaire (division symétrique). Si le partage est inégal, les cellules filles adoptent des destins différents. Par exemple, lors de la neurogénèse chez la Drosophile, Prospero et Numb sont des déterminants du destin neural localisés au pôle basal des neuroblastes. Au cours des divisions cellulaires, la cellule fille qui hérite de ces constituants basaux devient un précurseur de neurone. L'autre cellule fille reste un neuroblaste non engagé (Cabernard and Doe, 2009).

De nombreux travaux ont cherché à mettre en évidence l'existence de facteurs impliqués dans le partage des destins symétriques ou asymétriques durant la mitose des progéniteurs neuraux chez les vertébrés.

### - Héritage des pieds apicaux ou basaux et destin neural

Les premiers travaux de Chenn et Connel dans le cortex de furet suggèrent que les divisions dont le plan est perpendiculaire au plan apical génèrent deux progéniteurs, la division est donc symétrique. A l'opposé, des divisions dont le plan est parallèle au plan apical génèrent un progéniteur qui hérite du pied apical et un neurone qui hérite du pied basal (Chenn and McConnell, 1995). Cette configuration, ressemblant à celle observée chez la Drosophile (un modèle selon lequel le pied apical porterait des déterminants du destin progéniteur et le pied basal des déterminants proneuraux) a été soutenue plusieurs années. Dans les travaux de Kosodo *et al.*, il est même montré que c'est l'héritage égal ou inégal du pied apical qui définit le fait que la division soit symétrique ou asymétrique (Kosodo *et al.*, 2004). Pour ces auteurs, l'important serait donc le partage des déterminants entre les deux cellules filles dont le pied apical et non l'angle avec lequel la cellule mère se divise, la division pouvant paraître planaire sans un partage égal du pied apical.

De récents travaux, analysant les divisions des cellules progénitrices et le devenir des cellules filles sur plusieurs cycles cellulaires grâce à de l'imagerie « time lapse » à haute résolution et à l'aide de marqueurs apicaux, ont contredit ces



résultats : des divisions obliques peuvent générer deux progéniteurs et un neurone peut être généré à partir d'une cellule fille ayant hérité de la totalité ou d'une partie du pied apical. Durant la période proliférative, la majorité des progéniteurs se divisent avec un partage symétrique du pied apical (Asami et al., 2011; Konno et al., 2008; Shitamukai et al., 2011). Et dans les rares cas de divisions obliques (beaucoup moins fréquents que ceux estimés par Kosodo *et al*), le partage asymétrique du pied apical est compensé par une reformation d'un nouveau pied par la cellule en position basale. Durant la période neurogénique, là encore de nombreuses divisions donnant un progéniteur et un neurone, partage le pied apical de manière symétrique. La division paraît alors planaire et symétrique étant donné le partage égal du pied apical, suite à une rétractation du pied une cellule fille délamine et se différencie (Wilcock et al., 2007). Dans le cas de divisions obliques neurogéniques, le neurone hérite entièrement du pied apical alors que le progéniteur n'en hérite pas (149(Alexandre et al., 2010; Shitamukai and Matsuzaki, 2012) . Dans le cortex, ce type de progéniteur migre dans les couches plus basales et gardera son potentiel prolifératif (nommée cellule oRG-like ).

En conclusion, les neurones ou les progéniteurs intermédiaires qui donnent deux neurones à la division suivante dérivent le plus souvent d'une cellule fille qui a hérité de tout ou d'une partie du pied apical. A l'opposé, l'héritage du pied basal est corrélé au maintien du caractère souche/prolifératif de la cellule fille. De plus, l'importance de l'héritage du pied apical ou du processus basal dépend de la période considérée, ce qui suggère que l'expression de déterminants de destin varient entre la période proliférative et la période neurogénique. Des résultats convergents ont été obtenus dans le cortex de mammifères et le rhombencéphale du poisson zèbre, suggérant que ces principes pourraient être conservés aussi dans la moelle épinière (149(Alexandre et al., 2010; Shitamukai and Matsuzaki, 2012). En conséquence, Quels sont les déterminants de destin impliqués dans la neurogénèse ?

- Quels sont les déterminants du destin impliqués dans la neurogenèse ?

De nombreuses études ont été faites chez les mammifères par analogie avec la Drosophile et dans un contexte où la cellule fille basale était reconnue pour donner un neurone lors de division asymétrique. Dans ce contexte particulier, des études





portant sur leurs homologues chez les vertébrés ont apporté des conclusions assez contradictoires. Aussi, il est difficile de proposer un modèle clair aujourd'hui. C'est le cas par exemple de la voie Par3/Numb/Notch. Si nous nous plaçons dans le modèle souris, la protéine de polarité apical Par3 inhiberait l'activité de Numb (Nishimura and Kaibuchi, 2007) (lui-même un inhibiteur de Notch), ce qui maintiendrait la cellule fille apical dans un état prolifératif. La souris invalidée pour Par3, voit une différenciation plus précoce de ses progéniteurs avec la présence de progéniteurs ectopiques (Bultje et al., 2009). Les résultats obtenus chez le poisson zèbre traité avec un morpholino Par3, contredisent ces résultats : plus de divisions neurogéniques symétriques ont lieu ; la protéine Par3 et l'héritage du pied apical sont corrélés au destin neural et non au destin progéniteur comme conclu chez les mammifères (Alexandre et al., 2010; Shitamukai and Matsuzaki, 2012). Le fait de créer une souris invalidée pour Par3 perturbe la polarité de la cellule ce qui peut indirectement altérer les destins des progéniteurs. et expliquer ces résultats contradictoires. La place de ces voies doit être reconsidérée à la lueur des dernières données de time lapse et des expériences doivent être faites à l'échelle de l'observation subcellulaire pour mieux comprendre leur rôle.

*iii. L'orientation du fuseau mitotique a-t-elle un rôle dans la génération des neurones chez les vertébrés ?*

Le nombre de cellules progénitrices et le nombre de neurone générés dépendent d'un ratio entre divisions symétriques et asymétriques. La phase de prolifération des progéniteurs débutant la neurogénèse serait marquée par une forte proportion de divisions symétriques générant ainsi deux cellules filles identiques qui continueraient de proliférer. Plus tard dans la neurogénèse, la proportion de divisions asymétriques augmente, certaines de ces divisions asymétriques générant deux cellules filles aux identités différentes soit un progéniteur et une cellule post-mitotique. Parallèlement, des divisions dites symétriques neurogéniques génèrent deux neurones (en fin de neurogénèse) (Chenn and McConnell, 1995; Lu et al., 2000). La période pendant laquelle ces proportions évoluent dépend de l'organisme et de la région du système nerveux central dans lequel nous nous plaçons. Par exemple, dans la moelle épinière de la souris, le changement de type de division



s'effectue au stade embryonnaire E10.5 (Gotz and Huttner, 2005). Nous avons défini dans les parties précédentes les divisions symétriques et asymétriques en fonction de l'héritage des déterminants cytoplasmiques entre les deux cellules filles et non en fonction de l'orientation de la division. L'hypothèse de la distribution polarisée de déterminants entre le pied apical et le pied basal suggère que l'orientation des divisions cellulaires peut avoir un impact majeur sur le partage de ces déterminants et donc sur le destin des cellules filles. De manière simplifiée, des divisions planaires donc perpendiculaires au plan apical conduiraient à des destins symétriques ; des divisions obliques conduiraient à des destins différents.

De nombreuses études se sont intéressées à la corrélation de l'orientation des divisions des progéniteurs neuraux avec la génération des neurones (ou cellules gliales).

Par exemple, lors de la neurogenèse de la Drosophile, les études montrent que les cellules au niveau du neuroectoderme se divisent de manière symétrique et planaire par rapport au plan apical. Elle génère alors deux cellules filles identiques. Les neuroblastes, après leur délamination, se divisent de manière asymétrique et oblique par rapport à ce même plan et génèrent des cellules aux identités différentes : un neuroblaste et une cellule mère ganglionnaire (pour revue, voir (Jan and Jan, 2001)). Le neuroblaste hérite de la partie apicale de la cellule mère où l'on retrouve des protéines comme Pins, Mud et Insc vues dans la partie I.3., alors que la cellule mère ganglionnaire hérite des déterminants Numb et Prospero (Hirata et al., 1995). Une perte du déterminant Numb conduit à la génération de cellules filles identiques, c'est un antagoniste de Notch requis pour générer de la diversité cellulaire (Spana and Doe, 1996). Chez la Drosophile, l'orientation de l'axe de division des neuroblastes a donc un effet direct sur le statut symétrique et asymétrique de la division et par conséquent sur le destin/l'identité des cellules filles.

Chez les vertébrés les études et modèles se contredisent encore de nos jours. En 1995, Chenn et Connell montraient la corrélation entre l'orientation des divisions des progéniteurs neuraux et le destin des cellules filles au niveau du cortex de furet. Les divisions planaires par rapport au plan apical et symétriques, plus importantes en début de neurogenèse, génèreraient des progéniteurs participant ainsi à leur prolifération. Puis, un changement de l'axe des divisions au cours de la neurogenèse, engendrerait des divisions obliques et asymétriques générant un



neurone et un progéniteur ayant hérité de l'ancrage apical. Les premières critiques de ce modèle lui reprochaient que le nombre de divisions asymétriques n'était pas assez important pour expliquer le nombre de neurones générés (Huttner and Brand, 1997; Smart, 1973) et que ce nombre n'augmentait pas en fonction de la neurogénèse (Noctor et al., 2008). Cette critique a été remise en cause lorsque Kosodo et ses collaborateurs ont montré en 2004 que l'héritage égale ou inégal du pied apical définit le fait que la division soit symétrique ou asymétrique (Kosodo et al., 2004). D'après leurs analyses, le pied apical ne représente même pas 10% de la totalité de la membrane plasmique, une division peut alors paraître planaire bien qu'elle soit asymétrique. Ces auteurs ont proposé que de petites déviations de l'orientation des divisions pourraient générer des cellules filles aux destins différents. Plusieurs auteurs se sont donc intéressés à perturber l'orientation du fuseau mitotique et à regarder les conséquences sur le destin des cellules filles. Les travaux de Postiglione *et al.* en 2011 dans le néocortex, montrent ainsi que l'orientation du fuseau mitotique peut être impliquée dans la génération des progéniteurs basaux de la zone subventriculaire SZV (pour subventricular zone) du cortex. En effet, chez les souris mutantes pour *Inscuteable* (*mInsc*) l'homologue de *Insc* chez la *Drosophile*, le taux de divisions obliques diminue ce qui altère le nombre de progéniteurs basaux et de neurones générés. D'après les auteurs, une division planaire générerait un progéniteur et un neurone et une division oblique, un progéniteur et un progéniteur basal qui engendrera ensuite deux neurones.

Une corrélation entre la perturbation de l'angle de division et du destin des cellules filles a été mise en évidence dans d'autres études. Notamment lorsque l'expression de la protéine ASPM (pour Abnormal Spindle-Like Microcephaly Associated Protein), impliquée dans l'assemblage du fuseau mitotique, est perturbée. ASPM est exprimé au niveau des pôles du fuseau mitotique et sa perte de fonction conduit des défauts d'orientation du fuseau mitotique réduisant la précision des divisions planaires. Cette altération de l'orientation du fuseau s'accompagne d'une différenciation neuronale précoce (Fish et al., 2006) ce qui a pour conséquence de réduire la taille du cerveau, menant ainsi à une microcéphalie. D'autres protéines comme la Huntingtin et Lis1, détectées au niveau des pôles du fuseau mitotique ont un rôle dans l'orientation planaire du fuseau. Des perturbations de leur expression mènent à une mauvaise localisation de la dynactine et de NuMA, ce qui altère



l'orientation du fuseau mitotique. Là-encore ces défauts sont accompagnés de l'altération du destin cellulaire des progéniteurs de la zone ventriculaire du cortex (Alkuraya et al., 2011; Godin et al., 2010; Yingling et al., 2008).

A l'inverse, des études perturbant d'autres protéines impliquées dans le positionnement du fuseau mitotique ont apporté des conclusions différentes. Nous avons vu dans la partie I.3.a. que l'orientation du fuseau mitotique est régulée par le complexe Gai/LGN/Numa. Gai interagit avec le cortex de la cellule et LGN, LGN recrute Numa qui interagit avec les moteurs moléculaires de dynéine présents sur les microtubules astraux. Ce complexe ancre le fuseau mitotique au cortex de la cellule. Chez les vertébrés, sa localisation diffère de chez la *Drosophile* : le complexe est enrichi au niveau d'une ceinture latérale et non au côté apical de la cellule (Konno et al., 2008; Peyre et al., 2011). Cette localisation latérale contraint la rotation du fuseau mitotique pendant la métaphase puis sa stabilisation dans une orientation planaire (Konno et al., 2008; Peyre et al., 2011; Roszko et al., 2006). Une perturbation de la mise en place du complexe que ce soit par une surexpression de Gai ou une perte d'expression de LGN conduit à une orientation aléatoire du fuseau mitotique (Konno et al., 2008; Morin et al., 2007).

Contrairement à nos attentes, le taux de neurogenèse n'est pas affecté. Ce qui amène à conclure que l'orientation du fuseau mitotique n'est pas un paramètre dans le contrôle du destin des cellules filles des progéniteurs neuraux. En revanche, la perturbation de LGN conduit à la localisation ectopique de progéniteurs au niveau basal dans la zone du manteau. Dans cette situation, une orientation oblique du plan division a conduit une des cellules filles à perdre son ancrage apical permettant sa migration au niveau basal. . Ainsi l'orientation planaire des divisions des progéniteurs participerait à la conservation de l'intégrité du tissu neuroépithélial.

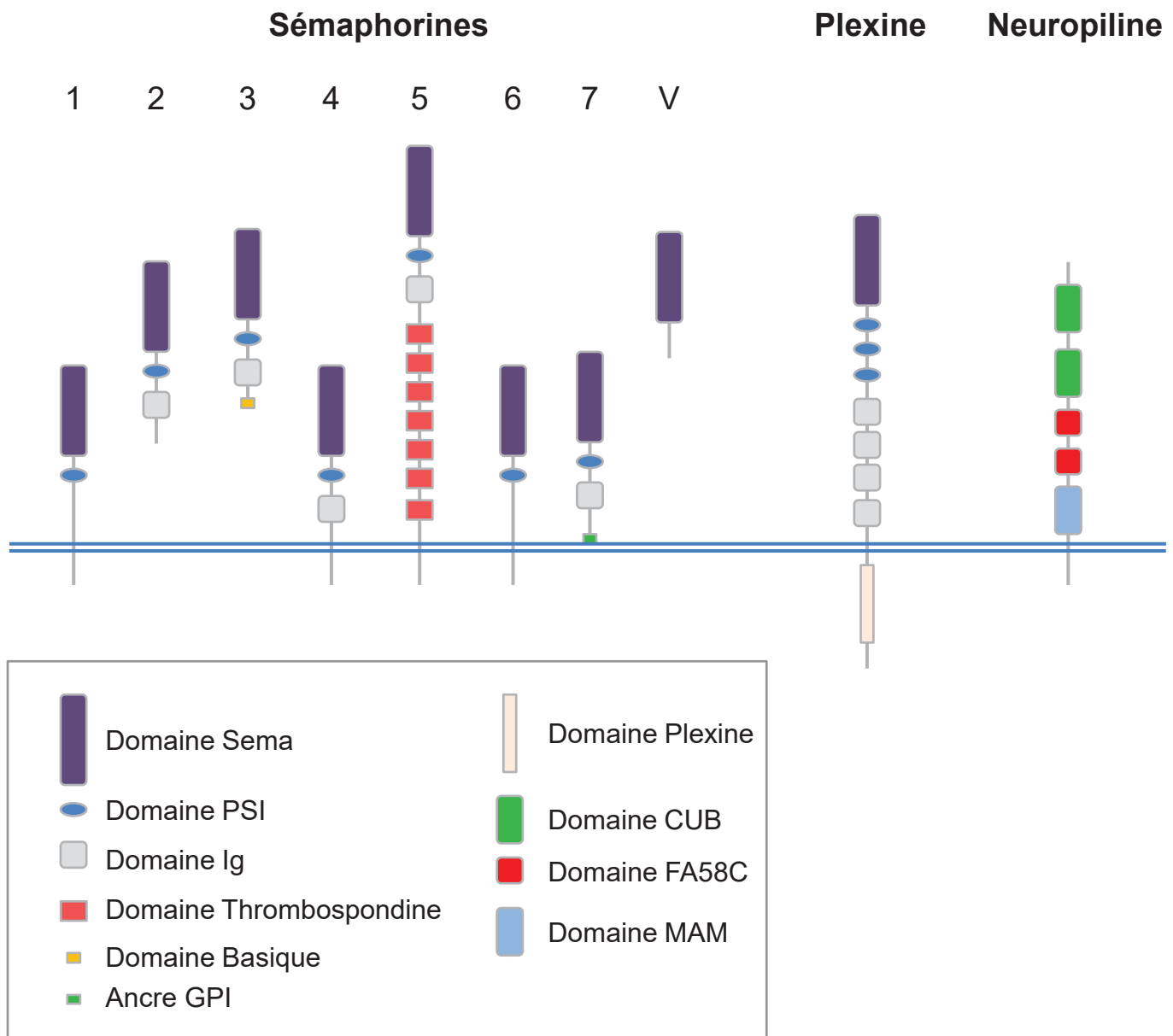
Il est encore difficile de donner des conclusions directes sur le rôle de l'orientation du fuseau mitotique dans la neurogenèse de la moelle épinière chez les vertébrés. Les recherches effectuées se contredisent et diffèrent en fonction des modèles étudiés, de la région dans laquelle nous nous plaçons mais aussi de la période de développement et des outils servant à analyser toutes les données. Cependant, les progrès sur la compréhension des mécanismes qui régulent la





neurogenèse et l'orientation du fuseau mitotique ont été d'une grande importance ces dernières années, la technique de la vidéo microscopie a permis de faire de nombreux progrès au niveau de la progression de la neurogenèse et de nombreux candidats régulant le choix du destin cellulaire sont proposés. Il est encore difficile de les lier entre eux pour établir un modèle. Néanmoins, les recherches se sont surtout ciblées sur les mécanismes intrinsèques régulant l'orientation du fuseau mitotique dans le plan apico-basal. Nous avons très peu de données dans les autres axes d'organisation (dorso-ventral et antéropostérieur) et sur les mécanismes extrinsèques qui réguleraient cette orientation et la mise en place du fuseau mitotique.

Durant ma thèse je me suis intéressé à la question de l'existence de signalisations extrinsèques régulant l'orientation du fuseau mitotique. Je me suis posé plusieurs questions relatives au contrôle de la neurogenèse. Est-ce que ces signalisations éventuelles influent sur la ségrégation des déterminants cytoplasmiques et ainsi à la neurogenèse? Est-ce que ces facteurs régulent de l'orientation du fuseau mitotique dans d'autres axes que l'apico-basal? Si oui, est-ce que cette fonction influence sur le destin des cellules filles?



**Figure 17 : La famille des Sémaphorines et leurs récepteurs.** Les membres de la famille des Sémaphorines se distinguent par la présence d'un domaine Sema, également retrouvé dans leur récepteur, Plexine. La sous famille des Sema3 regroupe les Sémaphorines sécrétées chez les vertébrés. Elles se fixent sur un membre de la famille des Neuropilines, le partenaire Plexine du complexe récepteur servant alors de co-récepteur de transduction du signal. Le domaine PSI (Pléxine-Sémaphorine-Intégrine) est aussi partagé par toutes les Sémaphorines sauf la classe V. Ce domaine, adjacent au domaine Sema du côté C-terminal, est riche en cystéine permettant la formation de ponts disulfures et de structures secondaires stables importantes pour l'interaction avec les récepteurs (Kozlov *et al.* 2004). D'autres domaines ou motifs ont été décrits, comme le domaine Immunoglobuline-Like (Ig), le domaine basique (pour les Sémaphorine de classe 3) ou le domaine Thrombospondine (spécifique des de la classe 5). Ils participent à certaines fonctions des Sémaphorines comme par exemple la potentialisation des effets du domaine Sema par les domaines PSI et basique (d'après Gherardi *et al.* 2004).

### III. LES SEMAPHORINES : SIGNAUX DE POSITION, CANDIDATS POTENTIELS DANS LA REGULATION EXTRINSEQUE DE L'ORIENTATION DU FUSEAU MITOTIQUE

#### 1. La famille des Sémaphorines, présentation

Les Sémaphorines (Sema) forment une famille de protéines membranaires ou sécrétées très conservée au cours de l'évolution et regroupées en différentes classes selon leur relation phylogénétique et leur similarité de motifs (He et al., 2002). Huit classes de Sémaphorines sont distinguées : les classes 1 et 2 chez les invertébrés, les classes 3 à 7 chez les vertébrés et la classe V chez les virus. Chez les vertébrés, la classe 3 regroupe les Sémaphorines sécrétées, la classe 7 celles possédant un domaine GPI et les classe 4, 5 et 6 comprennent les Sémaphorines transmembranaires. Les différents membres de la famille présentent une grande variabilité de séquence, ils partagent cependant un motif de 500 acides aminés, très conservé et essentiel à la médiation des effets de ces protéines : le domaine Sema (Yazdani and Terman, 2006). D'autres domaines identifiés sont partagés ou spécifiques à une classe de Sémaphorines (**Figure 17**).

Ces protéines ont été initialement découvertes pour leur rôle dans le guidage et la fasciculation des axones en croissance lors du développement du système nerveux (Kolodkin et al., 1993). Il a en effet été observé leur capacité à induire la rétraction de l'extrémité de l'axone ou « collapse » d'où leur désignation initiale de « Collapsin ». Il a été mis en évidence que ces propriétés de guidage étaient liées au rôle modulateur des Sémaphorines sur la dynamique du cytosquelette. Leur rôle ne se limite pas à un effet répulsif sur les axones. En effet, selon le contexte, les Sémaphorines peuvent aussi avoir un effet attractif (Adams et al., 1997; Christensen et al., 2005). De plus, elles peuvent guider des cellules entières en migration (Casazza et al., 2007), contrôler la croissance dendritique (Shelly et al., 2011) et la synaptogenèse (Tillo et al., 2012). Ainsi, les Sémaphorines sont des facteurs essentiels dans le positionnement de la cellule ou de compartiments cellulaires dans l'espace. Elles ont aussi la capacité de promouvoir la prolifération ou la maturation de cellules dans certains contextes comme par exemple pendant l'angiogenèse, la



morphogenèse du poumon ou la prolifération des cellules des crêtes neurales (Becker et al., 2011; Berndt and Halloran, 2006; Sadanandam et al., 2010). Au-delà du système nerveux, les Sémaphorines interviennent dans de multiples organes et fonctions chez l'embryon et l'adulte : comme le développement « cardiovasculaire » (Eichmann et al., 2005) et les fonctions immunitaires (Kikutani et al., 2007) par exemple. Enfin, les Sémaphorines ont été associées à des pathologies comme le cancer (Bielenberg and Klagsbrun, 2007), les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Ding et al., 2008; Uchida et al., 2005).

Les récepteurs classiques des Sémaphorines sont des membres de la famille des Plexines (Plx), excepté pour les Sema2 et Sema3 (les Sema3 interagissent avec les Plexines via les Neuropilines). La famille des Plexines est représentée par quatre catégories (A-D) et est caractérisée elle aussi par la présence d'un domaine Sema permettant l'interaction avec les domaines Sema des Sémaphorines (**Figure 17**) (Gherardi et al., 2004; Tamagnone et al., 1999). Certaines Sémaphorines peuvent agir par l'intermédiaire d'un complexe récepteurs de composition variée incluant des récepteurs et corécepteurs de type Plexines, Neuropilines (Yazdani and Terman, 2006), IgCam (Castellani, 2002), VEGF-R, CD72, TIM2, OTK (Roth et al., 2009) ou d'autres récepteurs moins connus.

## **2. Les Sémaphorines de la classe III (Sema3)**

### **a. Des facteurs chimiotropiques**

Les Sémaphorines sécrétées ont été les premières mises en évidence par Luo et ses collaborateurs en 1993. Ils ont en effet révélé l'existence d'un facteur collapsant pour le cône de croissance des neurones de DRG (Dorsal Roots Ganglia) (appelé tout d'abord collapsine puis Sema3A). Leur étude a révélé le caractère sécrété des Sema3 puisque les auteurs ont été capables de produire des milieux conditionnés à partir de transfections de leur ADNc dans des cellules COS (Luo et al., 1993).



Cette classe regroupe aujourd'hui sept membres notés Sema3A-G. Elles sont caractérisées par la présence d'un domaine basique permettant leur rétention par les protéines de la matrice extracellulaire qui limite leur diffusion, d'un domaine Ig, PSI et Sema (Arvan and Castle, 1998) (**Figure 17**). Grâce aux techniques d'hybridation *in situ* détectant les ARN des Sema3, de nombreuses sources de Sema ont été décrites à travers l'embryon (somites, aorte, membre, système nerveux central...). Cependant, si la nature sécrétée des Sema3 est bien démontrée, la distribution de la protéine après sécrétion est mal définie. En effet, il existe peu d'anticorps fiables permettant l'analyse de la localisation des Sema3 en coupes. Des expériences de « binding » utilisant des fragments de récepteurs comme sonde suggèrent des distributions en gradients des protéines autour de leurs sources (leur diffusion étant limitée par le domaine basique interagissant avec la matrice extracellulaire) (Luo et al., 1993). Néanmoins, des études plus précises sont requises pour mieux caractériser la localisation de ses Sémaphorines sécrétées.

Il est important de noter que l'expression des Sema3 est très dynamique au cours du développement. Ces ligands peuvent alors constituer des sources de guidage et d'informations de position localisées dans le temps et l'espace pour fournir un signal restreint à une population de cellules spécifique (Buck and Zheng, 2002). C'est le cas par exemple, dans la ligne médiane du cerveau où Sema3C est exprimée par une population transitoire de cellules en migration, les interneurones, qui participe alors à l'attraction des axones corticaux formant le corps calleux (Niquille et al., 2009). De plus, les Sema3 sont synthétisées sous la forme de précurseurs protéiques, les pro-Sémaphorines, qui subissent des clivages protéolytiques. Ceux-ci modulent l'activité des formes matures, par exemple, l'intensité de l'effet de répulsion. Ils peuvent aussi convertir leur activité répulsive en attraction. Par exemple, dans le contexte des cancers, Sema3E subit un clivage protéolytique qui diminue son activité répulsive ce qui permet l'invasion du poumon par des cellules métastatiques (Adams et al., 1997; Christensen et al., 2005).

Les Sema3s sont impliquées dans les fonctions de répulsion/attraction des axones et des cellules en migration (Yazdani and Terman, 2006). Grâce à leur activité répulsive, ou dans certains cas attractive, et leur patron d'expression sous forme de gradient, les Sema3 donnent des informations topographiques, des repères





spatiaux aux cellules et axones en migration pour ainsi les informer de leur position et diriger leurs mouvements vers leur cible et lieu de résidence. Pour modifier la trajectoire des cellules et axones, les Sema3 agissent sur le cytosquelette d'actine et de microtubules présents dans les lamellipodes et les filopodes. L'extrémité des axones en migration est appelée cône de croissance. C'est une structure très motile et extrêmement sensible qui permet une perception rapide et intégrative des différents signaux moléculaires présents dans son environnement proche afin d'orienter l'axone jusqu'à sa cible finale. Les effets sur la mécanique du cytosquelette s'exercent via différentes voies de signalisations classiquement impliquées dans les mouvements cellulaires. L'ensemble de ces processus d'expression et de maturation permet aux Sema3 de présenter un large éventail d'activités biologiques et de réguler finement les événements auxquels elles participent

### **b. Les complexes récepteurs des Sema3**

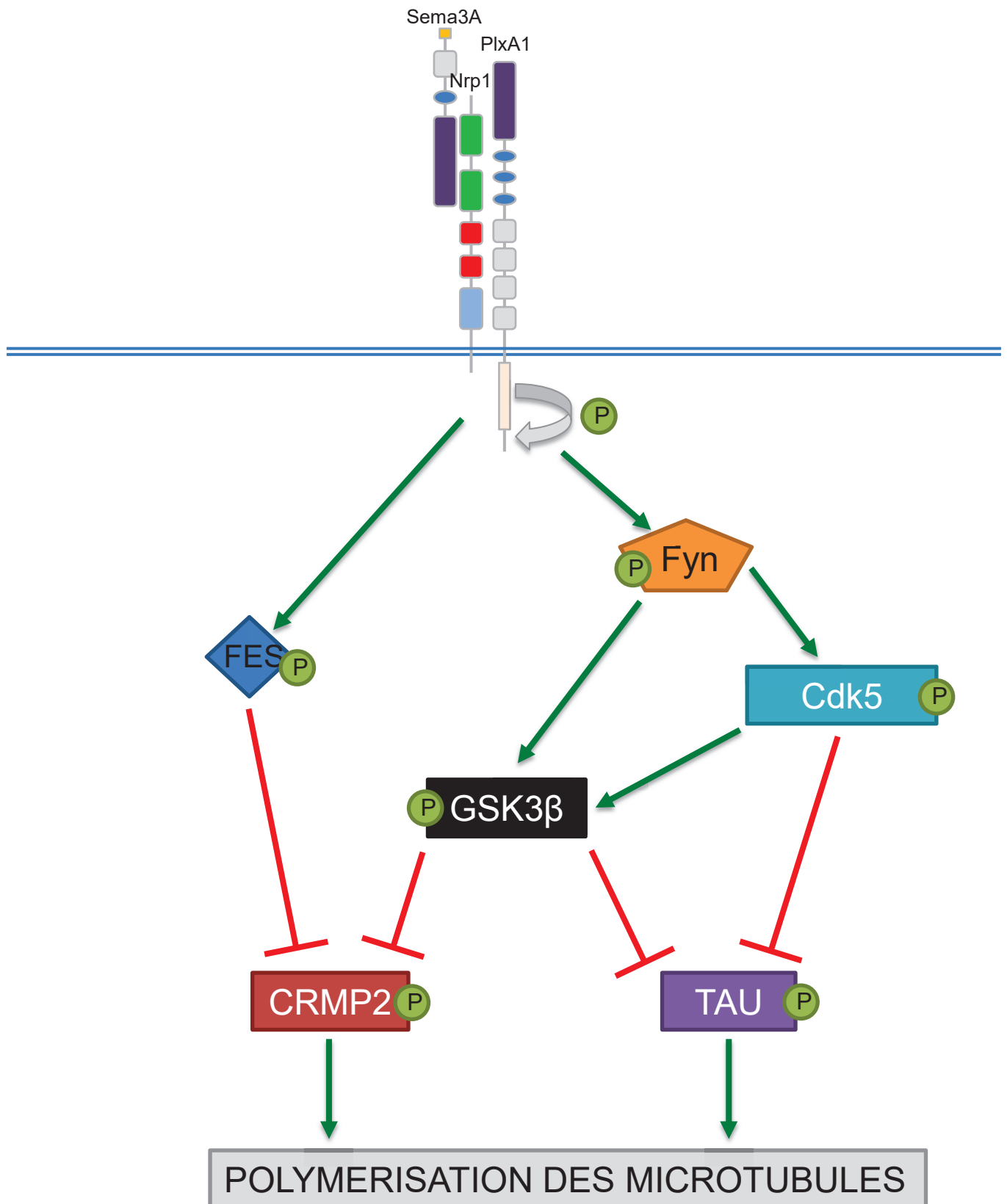
Les Sema3 ne sont généralement pas capables de se lier directement aux Plexines. Les récepteurs directs de cette classe sont les membres de la famille des Neuropilines, Nrp1 et Nrp2 (He et al., 2002). Les ligands Sema3 interagissent avec les Neuropilines via leur domaine CUB (Complement Binding Domain) (Nakamura et al., 1998). Sema3E constitue une exception car elle peut se lier directement à PlexD1 (Yazdani and Terman, 2006). Selon le membre, les affinités entre Sema3 et Nrp sont différentes. En effet, Sema3A n'interagit qu'avec Nrp1 tandis que Sema3B et Sema3C sont capables de se fixer aux deux Neuropilines (Takahashi et al., 2008), Sema3F en revanche se fixe à plus forte affinité sur Nrp2 que sur Nrp1 (Chen et al., 1998). Une compétition entre les différents membres des Sema3 ainsi qu'une action en synergie peut donc exister lorsqu'elles sont co-exprimées dans un territoire. Cet effet compétitif et intégratif peut avoir pour conséquence une modulation croisée de réponses aux différentes Sema3 (Sanyas et al., 2012b; Takahashi et al., 2008).

Les Neuropilines, possédant un tout petit domaine intra-cytoplasmique, ne sont pas capables de transduire le signal. La transduction est assurée par les Plexines servant alors de corécepteurs (Chen et al., 1998; Yazdani and Terman,



2006). Pour les Sema3, les Neuropilines et Plexines forment un complexe récepteur fonctionnel et de multiples combinaisons ont été observées. Malgré la diversité de complexes récepteurs créés par les partenaires Nrp/Plx, le nombre de Sema3 reste plus important. Par conséquent, plusieurs Sema3 sont capables de se lier aux mêmes complexes Nrp/Plx (Chen et al., 1997; Kawakami et al., 1996). Ainsi, la réponse d'une cellule aux différentes Sema3 qu'elle rencontre dépend de son répertoire d'expression de Nrp et Plx. Ce processus assure à une même cellule de nombreuses possibilités de réponse aux Sema3s et de modulations pendant le développement.

La diversité des complexes récepteurs aux Sema3 est accrue par la présence d'autres partenaires comme les facteurs d'adhésion L1 et CHLI qui interagissent avec Nrp1 (Castellani et al., 2000; Wright et al., 2007) ou NrCAM avec Nrp2 pour former un complexe récepteur à Sema3A et Sema3B dans les neurones corticaux (Nawabi et al., 2010). De même le récepteur au VEGF, VEGF-R2, s'associe au complexe PlxD1/Nrp1 et active une signalisation en aval de Sema3E qui médie l'élongation axonale des neurones du subiculum (Bellon et al., 2010). D'autres études ont montré qu'il existe d'autres partenaires des Plexines et Neuropilines comme Otk, ErkB2, Met dans les complexes récepteurs des Sema3 (Falk et al., 2005). L'ensemble de ses résultats met en évidence l'existence d'une grande diversité de récepteurs pour les Sema3 composé d'un « noyau » Nrp/Plx et de partenaires diverses modulaires. Cette diversité de complexes récepteurs est certainement une source majeure de la diversité des fonctions biologiques des Sémaphorines. La propriété particulière des Sema3 à interagir de manière indirecte avec les Plexines suggère que d'autres partenaires ou récepteurs « non classiques » pourraient exister. L'interaction des Sémaphorines sécrétées avec les Neuropilines est en effet une innovation tardive dans l'évolution que nous ne retrouvons que chez les vertébrés (chez les invertébrés Neuroglian, l'homologue de L1, serait le récepteur ancestral (Godenschwege and Murphey, 2009). Les Sémaphorines ont très bien pu développer des interactions avec d'autres molécules. La présence du domaine Sema est important pour l'interaction Sémaphorine/récepteur, nous pourrions donc penser qu'une Sémaphorine transmembranaire comme les Sema5 pourrait être un partenaire ou un récepteur aux Sema3 ou même de les Sema3 puissent interagir avec des récepteur pas encore identifiés en tant que tel.



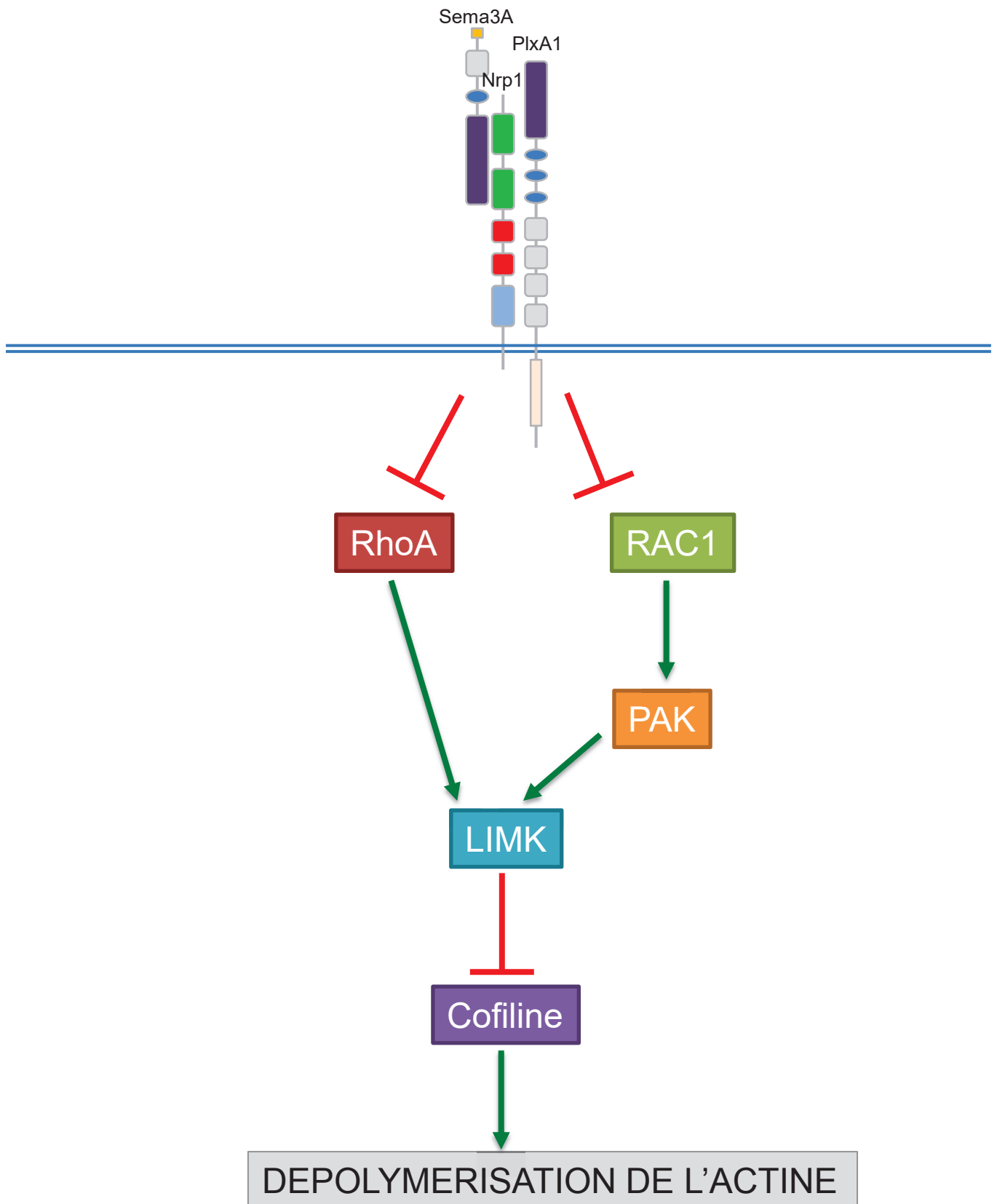
**Figure 18 : Sema3A inhibe la polymérisation des microtubules en inhibant l'activité de CRMP2 et Tau.** En se fixant sur son récepteur Nrp1, Sema3A active la phosphorylation de PlxA1 au niveau d'une tyrosine. Cette phosphorylation permet l'interaction des tyrosines kinase Fes et Fyn avec PlxA1 puis leur activation. Fes inhibe l'activité de CRMP2 et Fyn de CRMP2 et Tau par phosphorylation via Cdk5 et GSK3 β.

### **c. La signalisation des Semaphorines de la classe 3 et contrôle du cytosquelette**

Suite à l'activation de leur récepteur, les Sema3 activent de nombreuses voies de signalisation ayant principalement pour conséquence la modulation du cytosquelette de microtubules et d'actine indispensable à la migration cellulaire et au guidage du cône de croissance (Vikis et al., 2000). Au niveau des Sema3, les voies de signalisation les plus étudiées sont celles activées par Sema3A, 3B, 3E et 3F.

#### *i. Contrôle de la dynamique des microtubules par la signalisation Sema3*

Sema3A possède un effecteur : CRMP2 (pour Collapse, Response, Mediator, Protein) (Koncina et al., 2007), une phosphoprotéine cytosolique, qui intervient dans le phénomène de collapse en contrôlant la dynamique des microtubules. Son rôle est de s'associer aux hétérodimères de  $\alpha/\beta$  tubuline des microtubules et de promouvoir leur polymérisation (Fukata et al., 2002). Plusieurs voies de signalisation permettent de phosphoryler CRMP2 et ainsi d'inhiber son activité de stabilisateur de microtubules ce qui participe au processus de collapse/rétraction du cône de croissance. Lorsque les PlxA sont activées par les Sema3 via les Neuropilines, elles sont phosphorylées au niveau d'un résidu Tyrosine de leur domaine cytoplasmique (Tamagnone et al., 1999). Les PlxA recrutent alors des tyrosines kinases telles que Fes et Fyn. Fes activée par PlxA1 phosphoryle les protéines CRMP2 et CRAM (CRMP Associated Molecule) (Fukata et al., 2002; Mitsui et al., 2002). Lorsque Fyn interagit avec PlxA2, son activité augmente et elle phosphoryle alors la kinase Cdk5 qui phosphoryle à son tour CRMP2 (Fiore and Puschel, 2003; Sasaki et al., 2002) et une autre protéine qui stabilise les microtubules : Tau (Lew et al., 1995; Sasaki et al., 2002). CRMP2 et Tau sont aussi phosphorylées et inhibées par la kinase GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase), activée par la liaison de Sema3A au complexe récepteur. Les inhibitions de CRMP2 et Tau par GSK3 $\beta$ , Cdk5 et Fes/Fyn conduisent à une déstabilisation des microtubules et à la formation de collapses (Eickholt et al.,



**Figure 19 : Sema3A inhibe la polymérisation de l'actine en activant la Cofiline via l'inhibition de la voie LIMKinase.** En absence de Sema3A, RAC1 et RhoA sont actifs, ils inhibent la Cofiline par phoshorylation via le phosphorylation de la LIMKinase. Sema3A, induit la dépolymérisation de l'actine dans ce contexte.

2002). Il est fort possible de GSK3 $\beta$  soit en aval de Cdk5 (Uchida and Goshima, 2005) (**Figure 18**).

*ii. Contrôle de la dynamique de l'actine par la signalisation Sema3*

Les petites protéines G sont impliquées dans la signalisation des Sema3 ce qui leur permet de moduler la dynamique de l'actine, comme par exemple la cascade des RhoGTPase (RhoA/ROCK, Rac1, Cdc42, Rnd1) et MAPKinases (ERK1/2) (Campbell and Holt, 2003). Les RhoGTPases contrôlent la mobilité, la morphologie (la polarité intrinsèque et la forme) et le comportement cellulaire (prolifération, phagocytose, contraction), en jouant un rôle central dans la régulation de la dynamique de l'actine et des microtubules (Etienne-Manneville and Hall, 2002). L'activité GTPase de Rho est régulée par les GAPs (GTPase Activating Protein), qui stimulent l'activité GTPase menant à l'hydrolyse du GTP en GDP et les GEF, qui permettent l'échange du GDP en GTP et donc la formation de la conformation active.

Les petites protéines G régulent la dynamique de l'actine par l'intermédiaire de différentes voies dont la voie LIMKinase/Cofiline (voie évoquée dans la partie précédente (I.3.a.iv.)). La Cofiline active la dépolymérisation de l'actine afin de préserver un nombre stable de monomère de F-actine. LIMKinase, phosphorylée par Rac1 via PAK, s'active et inhibe la Cofiline en la phosphorylant ce qui permet la polymérisation de l'actine. Cette voie LIMKinase est inhibée par Sema3A via PlxA1 ce qui induit la dépolymérisation de l'actine et la formation de collapse au niveau du cône de croissance nécessaire pour son guidage (Turner et al., 2004), (Aizawa et al., 2001). De plus, Sema3A via PlxA1 est capable d'inhiber RhoA, un autre activateur de la LIMKinase, en activant la protéine p190RhoGAP via Abl2 (Shimizu et al., 2008) (**Figure 19**).

Ainsi, les voies de régulation du cytosquelette, dont nous avons montré qu'elles jouent un rôle central dans l'orientation des divisions cellulaires (Joberty et al., 2000) peuvent être contrôlées par les signaux Semaphorines. Le laboratoire dans lequel j'ai effectué ma thèse étudie depuis de nombreuses années les Sémaphorines dans le guidage axonal chez les vertébrés, au niveau des commissures de la moelle





épinière (Charoy et al., 2012; Nawabi et al., 2010) ainsi qu'au niveau des motoneurones (Sanyas et al., 2012b). Au cours de ces travaux, l'équipe a observé que plusieurs membres de la famille des Sémaphorines sont exprimés dans les progéniteurs du tube neural à des stades précoces du développement bien avant les étapes du guidage axonal. Nous nous sommes donc intéressés aux rôles des Sémaphorines dans ce système. Les Sémaphorines étant des molécules topographiques, donnant une information de position aux axones en croissance et cellules en migration, nous avons émis l'hypothèse qu'elles pourraient avoir un rôle dans le positionnement de ces progéniteurs neuraux de la moelle épinière et plus particulièrement dans l'orientation de leurs divisions.

J'ai tout d'abord étudié la possibilité que des signalisations extracellulaires participent à définir l'orientation des divisions des progéniteurs. En utilisant diverses approches *in vivo*, nous avons validé cette hypothèse. Puis nous avons cherché des signalisations candidates parmi les membres de la famille des Sémaphorines et nous avons mis en évidence un rôle clef de la Sémaphorine sécrétée Sema3B.



# CHAPITRE II : RESULTATS



## **I. SEMA3B, UN SIGNAL EXTRACELLULAIRE CONTROLANT L'ORIENTATION DE LA DIVISION DES PROGENITEURS NEURAX AU COURS DE LA NEUROGENESE PRECOCE DE LA MOELLE EPINIÈRE**

Lors de la période qui précède la neurogenèse primaire chez la souris, une majorité des divisions des progéniteurs neurax spinaux sont planaires, c'est-à-dire qu'elles s'effectuent perpendiculairement à l'axe apico-basal. Les autres divisions dites obliques présentent une déviation par rapport à cet axe. Le plus souvent cette déviation n'excède pas 30°. Le pourcentage de divisions obliques augmente durant la période de neurogenèse. Ces observations révèlent l'existence de mécanismes de régulation de l'orientation du fuseau mitotique. Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs rouages intrinsèques à la cellule sont mis en œuvre lors de la métaphase et de l'anaphase de mitose pour contraindre la position du fuseau au regard des axes de polarité cellulaire. Nous nous sommes demandé, si en complément de ces mécanismes intrinsèques, des signaux extracellulaires contribuaient à l'orientation de la division des progéniteurs par rapport aux tissus environnants, et si oui quelle en était la source. Nous nous sommes aussi demandé si des signaux pouvaient moduler le degré de déviation des divisions obliques voire de définir de manière précise l'angle de division par rapport à l'axe apico-basal.

Le canal central du tube neural fournit à différents temps du développement des facteurs essentiels dans la spécification des progéniteurs neurax comme les morphogènes Shh, BMP ou Wnt ou dans le contrôle de leur prolifération comme IGF2 (Lehtinen et al., 2011). Etant donné que les progéniteurs neurax de la moelle épinière effectuent leur mitose au niveau apical du neuroépithélium en contact avec le canal, nous avons émis l'hypothèse que ce canal pouvait receler des signaux contrôlant l'orientation de leurs divisions.

Si cette hypothèse était correcte, l'ouverture du tube neural dorsalement devait permettre de libérer ces signaux et d'en réduire les effets sur les progéniteurs neurax. Nous avons donc analysé l'orientation du fuseau mitotique des progéniteurs neurax sur des embryons de souris aux stades E10.5 et E11.5 maintenus en culture 3h après ouverture du tube neural. Ce temps de culture de 3h a été défini pour tester



l'existence de régulateurs à court terme de l'orientation des divisions. Ceci nous a permis de mettre en évidence la présence d'une signalisation au stade E10.5 mais pas à E11.5. Une perturbation des angles de division des progéniteurs neuraux à E10.5 est aussi montrée dans des embryons de souris transgéniques présentant un phénotype de "double-canal", c'est-à-dire qu'une barrière cellulaire ectopique bloque la diffusion entre les parties ventrales et dorsales, ces résultats suggérant la sécrétion de signaux au niveau ventral et la nécessité de leur diffusion au niveau dorsal du canal.

Par la suite, nous avons cherché à identifier les facteurs extrinsèques impliqués dans ce processus. L'équipe de Valérie Castellani s'intéresse historiquement aux rôles des Sémaphorines dans le guidage axonal. Ces protéines ont été très étudiées pour le rôle de signal de position et de contrôle de la dynamique du cytosquelette des axones et des cellules en migration. Des études précédentes au laboratoire ont révélé l'expression de plusieurs Sémaphorines dans les progéniteurs neuraux, ainsi que la plaque du plancher et la plaque du toit durant la neurogenèse. L'orientation du fuseau mitotique reposant sur un contrôle dynamique du cytosquelette d'actine et de microtubule, nous sommes demandés si certaines de ces sémaphorines pouvaient être impliquées dans l'orientation des divisions des progéniteurs neuraux. Nous nous sommes dans un premier temps focalisés sur la Sémaphorine 3B (Sema3B). En effet, cette Sema de classe III connue pour son rôle dans le guidage des axones commissuraux (Zou et al., 2000) est exprimée dans les cellules de la plaque du plancher au stade E12.5, ce qui laissait prédire une sécrétion de cette Sema dans le canal central. Par hybridation *in situ*, nous avons observé que l'ARNm de Sema3B est exprimé dans les cellules de la plaque du planché à des stades plus précoces, E10.5 et E11.5. Grâce à une lignée de souris knock-in exprimant la protéine fusion Sema3B-GFP, nous avons confirmé la présence de la protéine Sema3B dans les cellules de la plaque du plancher pendant la neurogenèse précoce. Nous avons aussi pu obtenir des milieux conditionnés contenant la Sema3B-GFP à partir de cultures de plaques du plancher issues de ces souris KI. Ainsi ces résultats montrent que Sema3B peut être sécrétée dans le canal de l'épendyme. Chez la souris invalidée pour Sema3B, l'orientation du fuseau mitotique des progéniteurs spinaux est altérée au stade E10.5, sans pour autant perturber l'organisation globale des pieds apicaux, du réseau de microtubules du





fuseau mitotique ou du cytosquelette cortical d'actine des progéniteurs neuraux. Ces défauts miment la perturbation observée chez les embryons dont le tube neural a été préalablement ouvert. De plus, l'exposition des embryons ouverts dorsalement à de la Sema3B-Fc exogène restaure les proportions des angles de division des progéniteurs. L'ensemble des résultats obtenus supportent un rôle direct de Sema3B sur l'orientation des divisions des progéniteurs neuraux de la moelle épinière.

En conclusion, nous montrons dans cette étude un rôle original de la Semaphorine 3B dans la neurogenèse précoce de la moelle épinière. Ces travaux suggèrent que Sema3B donnerait une information de position aux progéniteurs neuraux pour les maintenir dans une orientation planaire pendant une fenêtre de temps très précise, au stade E10.5. Cette étude montre aussi qu'en plus de son rôle d'organisateur, la plaque du plancher émet un signal contrôlant l'orientation des divisions cellulaires. Ces travaux font l'objet d'un article en rédaction en format "letter" pour une soumission aux revues Nature, Nature Neurosciences, ou Neuron.



# **Semaphorin3B is a Neural tube canal-derived extracellular signal for progenitor division orientation**

Elise Arbeille<sup>1</sup>, Isabelle Sanyas<sup>1</sup>, Florie Reynaud<sup>1</sup>, Muriel Bozon<sup>1</sup>, Frédéric Causeret<sup>2</sup>,  
Alessandra Pierani<sup>2</sup>, Karine Kindbeiter<sup>1</sup>, Julien Falk<sup>1</sup>, Frédéric Moret<sup>1\*</sup>, Valérie Castellani<sup>1\*#</sup>

<sup>1</sup>University of Lyon, University of Lyon1, CGΦMC, UMR CNRS 5534, Villeurbanne France,

<sup>2</sup>University of Paris 7, Jacques Monod Institute, Paris, France.

\* equal contribution

# Corresponding author: valerie.castellani@univ-lyon1.fr

In multicellular organisms, the orientation of cell divisions relative to the apicobasal surface and tissue axes largely impacts on morphogenesis and cell fate determination. In the vertebrate developing central nervous system, progenitors mostly undergo planar or slightly oblique divisions, respectively orthogonal or sub-orthogonal to the epithelium plane, to allow neural tube expansion and generation of neurons. The preservation of the division orientation has been shown crucial for proper neuroepithelium architecture and integrity<sup>1,2</sup>. Up to now, the intrinsic molecular machinery controlling mitotic spindle orientation received much attention<sup>3,4</sup>. In contrast, the potential implication of extracellular signaling in orienting the divisions is yet unknown. Here using the mouse spinal cord model, we first report that altering the central canal integrity either genetically or by neural tube incision affects the respective proportion of planar and oblique divisions. Second, we show that genetic loss of the chemotropic cue Semaphorin3B (Sema3B), found secreted by the ventral patterning center of the spinal cord, the floor plate, alters the normal ratio of planar/oblique divisions. This



results in followed by an alteration of spinal cord morphogenesis and timing of neuron birth. Finally, exogenous Sema3B delivery to apical progenitors was found to counteract the consequences of neural tube opening. This first reveals unexpected contribution of extracellular cues in the control of progenitor division orientation in neurogenic zones and identifies a major function of Sema3B. Second, this also shows that beyond its fundamental role in controlling the spinal cord cell patterning, the floor plate has important contribution in the orientation of progenitor division. Such requirement likely applies to the brain ventricular zones, where cortical progenitors also receive diffusible signals from patterning centers and whose division orientation is also tightly controlled<sup>5,6</sup>.

In the neuroepithelium, the cell cycle phases take place at different locations, the progenitors undergoing an interkinetic nuclei migration which positions the mitosis at the apical pole, close to the canal, and the S phase at the basal pole<sup>7</sup>. We hypothesized that the central canal could supply the apically located progenitors in M phase with some extracellular cues contributing to orient the divisions in the tissue. To test this hypothesis, we thought to interfere with the delivery of extracellular cues by opening the central canal. We set up an in vivo model whereby mouse embryos in which the neural tube was dorsally incised in open book configuration or left intact were maintained ex utero for 3 hours in neurobasal medium (Fig. 1a). The embryos were subsequently sectioned and the mitotic spindle orientation of spinal neuroepithelial cells in anaphase in the apical plane was analyzed. These experiments were performed at the onset of neurogenesis at E10.5 and E11.5, where the proportion of asymmetric divisions has increased. Accordingly at E11.5, a substantial proportion of oblique angles were observed. Nevertheless, no difference could be noticed between intact and open conditions, thus indicating that cell division orientation is not altered by neural tube manipulations at this stage (Fig. 1c, e, S1a). In contrast at E10.5, the percentage of planar



divisions ( $90^{\circ}$ - $80^{\circ}$ ) was strongly decreased in open embryos compared to intact ones, with oblique divisions increasing in mirror (Fig. 1b, d, S1a). Notably, cells displaying horizontal division plane ( $0^{\circ}$ - $30^{\circ}$ ) were observed in the open condition, which was never the case in intact controls (Fig. 1b). Thus at the onset of neurogenesis, delivery of extracellular cues to apical progenitors via the central canal might be required to maintain planar or subplanar divisions.

If this is true, then interfering with the canal flow should impact on progenitor division. To address this question, we took advantage of a PGK:CRE:Dbx1-IRES-loxP-Stop-loxP-DTA mouse line, which we found to exhibit an obstructed canal. In the spinal ventricular zone dbx1+ progenitors lie at intermediate dorsoventral level. We observed that their genetic ablation resulted in fusion of the ventricular borders at the site of the missing progenitors, and formation of a double (ventral and dorsal) canal (line referred to as “double-canal line (DC)”, see Methods and Fig. 1f). Adjacent progenitor domains were unaffected by the ablation, as shown with immunoabeling of the olig2, Nkx6.1, Nkx2.2 and Pax7 markers (Fig. S2). This genetic line was thus an ideal model for our purpose. The division orientation of progenitors residing in the dorsal and ventral compartment of E10.5 embryos was analyzed. Remarkably in the mutants, the proportion of planar divisions decreased in the dorsal compartment having no access to cues delivered in the canal from ventral tissue, whereas it was unchanged in the ventral compartment, compared to wild-types (Fig. 1g, h, S1b). Thus, preventing the access of progenitors to signals delivered by ventral tissue in the canal compromises planar divisions.

Next, we searched for extracellular cues that could mediate these effects. Mitotic spindle orientation largely relies on astral microtubules and cortical actin cytoskeleton. We





hypothesized that extracellular cues known to regulate actin and microtubule dynamics, as those controlling the guidance of axonal growth cones could be good candidates. We and others previously reported expression of Semaphorin family members, among which the secreted Semaphorin3B, in the floor plate, flanking the ventral border of the canal, by the time axons navigate in the spinal cord at E12.5. Interestingly, at E9.5 and E10.5, Sema3B mRNA was already detected, and specifically in the floor-plate and in the notochord. At E11.5, Sema3B mRNA expression expanded to the ventral progenitors (Fig. 2a). Thus, Sema3B was a good candidate in our search of canal-derived signals with ventral origin. To characterize the Sema3B profile at protein levels and due to lack of suitable anti-Sema3B antibody we engineered a GFP-Sema3B Knock-in mouse line in which the EGFP was inserted into the N-terminal end of Sema3B (Fig. S3). Anti-GFP immunostaining on E10.5 cryosections revealed strong signal in floor-plate cells lining the ventricle and their radial processes, as well as in the notochord (Fig. 2c). At E11.5, Sema3B-GFP localized in the floor-plate and in progenitor cells, and could be detected along their apical process (Fig. 2d). Next, to confirm Sema3B secretion, isolated floor plates from GFP-Sema3B KI embryos were cultured for 2 days, and Sema3B could be detected in the conditioned medium by immunodetection of the GFP in dot blot (Fig. 2b). Thus Sema3B has the expected expression profile and functional properties to potentially regulate the orientation of progenitor divisions.

To address this idea, we examined the consequences of genetic invalidation of Sema3B on spinal progenitor divisions. Strikingly, the percentage of planar divisions was significantly reduced in favor of oblique divisions in E10.5 Sema3B<sup>-/-</sup> embryos compared to wild types. Moreover and as expected from our observations of the divisions in the DC mouse line, this effect was observed not only in the ventral but also in the dorsal ventricular zone (Fig. 3a, c, S1c, S4). Moreover, Sema3B invalidation mimicked the *in vivo* neural tube



opening leading to abnormal horizontal mitosis plane. Finally, no significant effect of *Sema3B* loss was observed at E11.5 as in the open book paradigm (Fig. 3b, d, S1c).

Reduced proportion of planar divisions could result from direct deregulation of the division angle or from indirect alteration of number of progenitors undergoing planar and oblique divisions. In this latter case, it could be due to earlier depletion of cycling progenitors that normally would have undergone planar division or to increase of neurogenic progenitors which divide asymmetrically. Counting of cycling progenitors using phospho-Histone<sup>H3</sup> (PH3) immunolabeling revealed that the number of mitotic cells was not modified in E10.5 *Sema3B* null embryos, compared with wild-types (Fig. 3e, f). Moreover, *Tis21*, a marker of neurogenic progenitors, had comparable expression profile in E10.5 *Sema3B*<sup>-/-</sup> and <sup>+/+</sup> embryos, thus indicating that the ratio of neurogenic/proliferative divisions was not affected by *Sema3B* loss (Fig. 3h, i, j). Additional analysis performed to investigate the ventricular zone morphology, progenitor populations, adherens junctions, cytoskeleton and apical marker distribution, indicated neither gross alteration of the ventricular zone integrity nor sharp cellular and molecular disorganization (Fig. S5, S6). Altogether, these data thus highly suggested that the reduction of planar divisions might result from direct deregulation of the orientation of progenitor division. The final position of the mitotic spindle prefiguring the orientation of the cytokinesis is set at the metaphase. Consistent with alteration of the setting of division angles, a slight but significant increase in the percentage of cells in metaphase among PH3<sup>+</sup> progenitors could be detected in E10.5 *Sema3B*<sup>-/-</sup> embryos compared to their <sup>+/+</sup> counterparts (Fig. 3g).

If *Sema3B* has direct effect on planar orientation of divisions and is one major extracellular cue whose access to progenitors was prevented in the open book paradigm, then



short *Sema3B* exposure should restore planar divisions. Remarkably, 3 hours application of *Sema3B*-Fc on top of E10.5 open spinal cords was sufficient to significantly increase the percentage of planar divisions, compared to controls (Fig. 4a, b, S1d). Moreover, abnormal horizontal divisions typical of the open condition were no longer observed. Thus, short term exposure of apically located progenitors to exogenous *Sema3B* can significantly counteract the effects of neural tube opening, thus supporting direct function of this extracellular cue on the division orientation. Finally, alterations of the progenitor division angles first might have consequences on the spinal cord tissue shape. Second, decreasing planar divisions in favor of oblique divisions might impact on the birthdate of neurons. Consistently, quantitative analysis revealed significant decrease of the size of the spinal cord, in the *Sema3B* null embryos compared to wild-types (Fig. 4c, d). This difference was even more prominent when embryos were compared intra litter (Fig. 4e). Moreover, BrdU pulse at E10.5 and analysis at E12.5 revealed striking differences of BrdU distribution. In the null embryos, abnormally numerous BrdU<sup>+</sup> neurons were found accumulated in the most lateral portion of the ventral motoneuron and intermediate domains, unlike in wild-type embryos (Fig. 4c). In addition, the population of BrdU<sup>+</sup> postmitotic cells in the dorsal mantle zone was strongly reduced in *Sema3B*<sup>-/-</sup> embryos compared to wild type littermates. Thus, loss of *Sema3B* at E10.5 results in aberrant timing and level of neuron birth.

Overall, our data show that chemotropic cues known to provide topographic information to migrating cells and axons act earlier to position the progenitor division in the body axes (Fig. 4f). Whether other guidance cues share *Sema3B* properties is consistent with some reported expression patterns in proliferative zones of the nervous system<sup>8,9</sup>. It remains to elucidate how is this effect of *Sema3B* achieved. Microtubules and actin are potential targets given the properties of the Semaphorin signaling to regulate the cell cytoskeleton. Indeed,



altering the microtubule associated complex NuMA/LGN/G $\alpha$ i anchoring the mitotic spindle by LGN loss of function strongly impacted on the orientation of the divisions in the vertebrate spinal cord<sup>2</sup>. Finally, our study also shows that alteration of the planar/oblique divisions is followed by abnormal timing of neuron birth. Whether or not the orientation of the progenitor divisions is instructive for cell fate determination in the vertebrate nervous system is still under debate<sup>10</sup>. Cell fate mapping analysis in context of Sema3B gain and loss of function could thus bring insights into this question. Beyond, functional consequences of such neuron birth defects are unknown but could affect the local spinal cord circuitry, since interneurons participating to distinct premotor circuits were shown to differ by the timing of their neurogenesis<sup>11</sup>.

## Methods Summary

### Animals.

*Sema3B*<sup>-/-</sup> mice construct and genotyping have been described previously<sup>12</sup>. For the construction of the *Sema3B-GFP KI* allele, the coding sequence of *eGFP* (Clontech) was fused to the N-terminal part of Sema3B (Figure S2). The PGK:Cre; Dbx1-IRES-loxP-Stop-loxP-DTA mouse line has been described previously<sup>13</sup>.

### "Open book" surgery.

The neural tube of OF1 mouse embryos was dorsally incised in «Open-Book» configuration at stage E10.5 and E11.5. Embryos were subsequently incubated for 3h in B27-supplemented (Gibco) Neurobasal medium (Gibco). For rescue experiments, Sema3B-Fc chimera protein (R&D Systems) was added to the Neurobasal medium.





## Quantifications.

The number of PH3+ cells normalized by spinal cord height gives the mitotic index. The proportion of cells in Pro/Meta/Anaphase was expressed as a percentage of the PH3+ cells. High magnification 3D stacks of anaphase cells were obtained by confocal microscopy. The (x,y,z) coordinates of both centrosomes ( $\gamma$ -tubulin+) (C and C') and 3 points delineating the apical plane (A1, A2 and A3) were measured with ImageJ software. The angle ( $\alpha$ ) between the apical plane and the division plane was then calculated using the following formula.

$$\text{COS}(\alpha) = \left| \frac{(x_{C'} - x_C)((y_{A2} - y_{A1})(z_{A3} - z_{A1}) - (y_{A3} - y_{A1})(z_{A2} - z_{A1})) + (y_{C'} - y_C)((x_{A3} - x_{A1})(z_{A2} - z_{A1}) - (x_{A2} - x_{A1})(z_{A3} - z_{A1})) + (z_{C'} - z_C)((x_{A2} - x_{A1})(y_{A3} - y_{A1}) - (x_{A3} - x_{A1})(y_{A2} - y_{A1}))}{\sqrt{((y_{A2} - y_{A1})(z_{A3} - z_{A1}) - (y_{A3} - y_{A1})(z_{A2} - z_{A1}))^2 + ((x_{A3} - x_{A1})(z_{A2} - z_{A1}) - (x_{A2} - x_{A1})(z_{A3} - z_{A1}))^2 + ((x_{A2} - x_{A1})(y_{A3} - y_{A1}) - (x_{A3} - x_{A1})(y_{A2} - y_{A1}))^2} \right| \sqrt{((x_{C'} - x_C)^2 + (y_{C'} - y_C)^2 + (z_{C'} - z_C)^2)}$$

The spinal cord area was analyzed in transverse sections with ImageJ software.

- 1 Konno, D. *et al.* Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nature cell biology* **10**, 93-101, doi:10.1038/ncb1673 (2008).
- 2 Morin, X., Jaouen, F. & Durbec, P. Control of planar divisions by the G-protein regulator LGN maintains progenitors in the chick neuroepithelium. *Nature neuroscience* **10**, 1440-1448, doi:10.1038/nn1984 (2007).
- 3 Morin, X. & Bellaiche, Y. Mitotic spindle orientation in asymmetric and symmetric cell divisions during animal development. *Developmental cell* **21**, 102-119, doi:10.1016/j.devcel.2011.06.012 (2011).
- 4 Gillies, T. E. & Cabernard, C. Cell division orientation in animals. *Current biology : CB* **21**, R599-609, doi:10.1016/j.cub.2011.06.055 (2011).
- 5 Huttner, W. B. & Kosodo, Y. Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Current opinion in cell biology* **17**, 648-657, doi:10.1016/j.ceb.2005.10.005 (2005).
- 6 Kiecker, C. & Lumsden, A. The role of organizers in patterning the nervous system. *Annual review of neuroscience* **35**, 347-367, doi:10.1146/annurev-neuro-062111-150543 (2012).
- 7 Sauer, M. E. & Chittenden, A. C. Deoxyribonucleic acid content of cell nuclei in the neural tube of the chick embryo: evidence for intermitotic migration of nuclei. *Experimental cell research* **16**, 1-6 (1959).



- 8 Borrell, V. *et al.* Slit/Robo signaling modulates the proliferation of central nervous system progenitors. *Neuron* **76**, 338-352, doi:10.1016/j.neuron.2012.08.003 (2012).
- 9 Qiu, R. *et al.* Regulation of neural progenitor cell state by ephrin-B. *The Journal of cell biology* **181**, 973-983, doi:10.1083/jcb.200708091 (2008).
- 10 Peyre, E. & Morin, X. An oblique view on the role of spindle orientation in vertebrate neurogenesis. *Development, growth & differentiation* **54**, 287-305, doi:10.1111/j.1440-169X.2012.01350.x (2012).
- 11 Tripodi, M., Stepien, A. E. & Arber, S. Motor antagonism exposed by spatial segregation and timing of neurogenesis. *Nature* **479**, 61-66, doi:10.1038/nature10538 (2011).
- 12 Falk, J. *et al.* Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron* **48**, 63-75, doi:10.1016/j.neuron.2005.08.033 (2005).
- 13 Causeret, F. *et al.* Dbx1-expressing cells are necessary for the survival of the mammalian anterior neural and craniofacial structures. *PloS one* **6**, e19367, doi:10.1371/journal.pone.0019367 (2011).
- 14 Moret, F., Guiland, J. C., Coudouel, S., Rochette, L. & Vernier, P. Distribution of tyrosine hydroxylase, dopamine, and serotonin in the central nervous system of amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*): implications for the evolution of catecholamine systems in vertebrates. *The Journal of comparative neurology* **468**, 135-150, doi:10.1002/cne.10965 (2004).
- 15 Henrique, D. *et al.* Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* **375**, 787-790, doi:10.1038/375787a0 (1995).
- 16 Iacopetti, P. *et al.* Expression of the antiproliferative gene TIS21 at the onset of neurogenesis identifies single neuroepithelial cells that switch from proliferative to neuron-generating division. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 4639-4644 (1999).

**Acknowledgements:** This work was supported by ERC (European Research Council) to VC, MENRT to EA, and the Labex CORTEX. We thank Olivier Gipouloux for the mathematical formula used for angle calculation.



## Legends

**Figure 1:** *Analysis of division orientations in Open and Double Canal embryos at E10.5 and E11.5.* **a**, Schema of the open-book surgery. **b,c,g** Histograms showing planar (80-90°) and oblique (60-80°, 30-60°, 0-30°) division proportions in closed or "open" embryos and ventral or dorsal progenitors in WT and DC embryos. **d,e,h** Confocal images of Anaphase cells, with PH3 and  $\gamma$ -tubulin staining. Division and apical plane are indicated in dotted lines. **f**, ZO1 and Islet1/2 staining on WT and DC spinal cord section. The percentage of oblique divisions increases in Open and DC E10.5 embryos. Scale bars, d,e,h: 5 $\mu$ m, f: 100 $\mu$ m and 30 $\mu$ m.

**Figure 2:** *Sema3B expression in the spinal cord at stage E9.5-E11.5.* **a**, *In situ* hybridization of Sema3B. **b**, anti-GFP immuno-blotting on GFP<sup>cm</sup> and Sema3B-GFP<sup>cm</sup> from transfected HEK293T cells and on WT and Sema3B<sup>gfp/gfp</sup> FP<sup>cm</sup>. Sema3B-GFP is detected in FP<sup>cm</sup> from Sema3B<sup>gfp/gfp</sup> embryos. **c,d**, Confocal images of GFP staining on Sema3B<sup>gfp/gfp</sup> spinal cord section. Sema3B mRNA and Sema3B-GFP are detected in floor plate cells at E9.5 and E10.5 and expand in ventral progenitors at E11.5. Scale bars, a,c,d: 100 $\mu$ m, c and d floor-plate and progenitor cell: 10 $\mu$ m.

**Figure 3:** *Sema3B Knockout mice analysis at E10.5 and E11.5.* **a-b**, Histograms showing planar and oblique division proportions in Sema3B<sup>+/+</sup> and <sup>-/-</sup> embryos. **c-d**, Confocal images of anaphase cells, with PH3 and  $\gamma$ -tubulin staining. Division and apical plane are indicated in dotted lines. **e**, PH3 immunofluorescence in spinal cord of Sema3B<sup>+/+</sup> and <sup>-/-</sup> embryos, labeling mitotic progenitor cells. **f**, Histogram of the mitotic index in Sema3B<sup>+/+</sup> and <sup>-/-</sup> spinal cord. The number of mitotic progenitors is not altered by Sema3B<sup>-/-</sup>. **g**, Percentage of mitotic phases of spinal progenitors in Sema3B<sup>+/+</sup> and <sup>-/-</sup>: Prophase (P), Metaphase (M), Anaphase



(A). The percentage of metaphase cells increases in  $Sema3B^{-/-}$ . **h**, *in situ* hybridization of *Tis21* in  $Sema3B^{+/+}$  and  $^{-/-}$  spinal cord. **i,j** *Tis21* mRNA staining area (**i**) and intensity (**j**). Scale bars, c,d: 5 $\mu$ m, e,h: 100 $\mu$ m.

**Figure 4:** *Sema3B* function in spinal neural progenitor division orientation at E10.5 and consequences at E12.5. **a**, Histograms showing planar and oblique division proportions in WT open-book embryos treated for 3hrs with various doses of *Sema3B*-Fc. **b**, Confocal images of anaphase cells. Exposure of open-book spinal cords to *Sema3B*-Fc increases the percentage of planar divisions. **c**, Confocal images of BrdU<sup>+</sup> and *Islet1/2*<sup>+</sup> cells at E12.5, 48hrs after BrdU injection. **d**, Spinal cord area at E12.5 in  $Sema3B^{+/+}$  and  $Sema3B^{-/-}$  embryos. **e**, Intra-litter comparison of spinal cord areas. The spinal cord area decreases and the normal distribution of the BrdU<sup>+</sup> cells is altered by *Sema3B* deletion. **f**, Model of *Sema3B* action on spinal progenitor cells proposing that *Sema3B* is an ependymal canal-derived extracellular signal for progenitor division orientation. Scale bars, b: 5 $\mu$ m, c: 100 $\mu$ m.





## Supplementary Legends

**Supplementary Figure 1:** *Distribution of division orientation angles at E10.5 and E11.5. a,* Closed and Open embryos. **b,** Control and Double Canal (DC) mutant embryos. **c,**  $Sema3B^{+/+}$  and  $Sema3B^{-/-}$ . **d,** Open embryos following 3h exposure to Sema3B-Fc. Each point depicts a single cell. These clouds of points illustrate the alteration of the division angle distribution in OB, DC Mutant and  $Sema3B^{-/-}$  at E10.5. Exposure of open spinal cords to 5 $\mu$ g/ml Sema3B-Fc partially restores the distribution of the division angles.

**Supplementary Figure 2:** *Progenitor populations in WT and DC Embryos at E10.5. Anti-Olig2 (a), Nkx6.1 (b), Pax7 (c, up) and Nkx2.2 (c, low) immunostaining on WT and DC spinal cord sections. No gross alteration of Olig2, Nkx6.1, Pax7 and Nkx2.2 progenitor domain position is seen in DC embryos. Scale bar 100 $\mu$ m.*

**Supplementary Figure 3:** *Sema3B-GFP KI mouse construct. a,* Sema3B-GFP Knock-in targeted locus. eGFP sequence was inserted in Ex4 to fuse GFP with the N-terminal part of Sema3B downstream of the signal peptide. 2 LoxP sequences were inserted in introns flanking exons 3 and 6 to generate conditional Sema3B mutants.

**Supplementary Figure 4:** *Histograms showing planar and oblique division proportions in the ventral and dorsal parts of  $Sema3B^{+/+}$  and  $Sema3B^{-/-}$  embryos. Sema3B invalidation alters the orientation of progenitor divisions in both dorsal and ventral parts of the spinal cord.*

**Supplementary Figure 5:** *Neural progenitor polarity, mitotic spindle organization and cortical actin in  $Sema3B^{+/+}$  and  $Sema3B^{-/-}$  E10.5 embryos. a,* Confocal images of ZO1



(white), actin (red) and aPKC (green) staining at the level of neural progenitors apical feet (planar view). No gross alteration of apical foot morphology is observed in the *Sema3B* mutants. **b,c**, Confocal images of acetylated  $\gamma$ -tubulin (**b**) and actin (**c**) staining in metaphase and anaphase neural progenitors (planar view). Cortical actin and mitotic spindles are detected with similar patterns in both conditions. Scale bars a: ZO1, 10 $\mu$ m, aPKC and actin: 3 $\mu$ m, b and c: 5 $\mu$ m.

**Supplementary Figure 6:** The *Dorso-ventral patterning is not altered in Sema3B mutants.*

**a**, Anti-Olig2 and anti-Nkx2.2 immunostaining on *Sema3B*<sup>+/+</sup> and *Sema3B*<sup>-/-</sup> E11.5 spinal cord cross sections. **b**, Anti-Pax7 (upper) and anti-Nkx6.1 (lower) immunostaining in *Sema3B*<sup>+/+</sup> and *Sema3B*<sup>-/-</sup> E11.5 spinal cord sections. *Sema3B* invalidation does not alter the position of spinal Pax7<sup>+</sup>,Nkx6.1<sup>+</sup>,Olig2<sup>+</sup>,Nkx2.2 progenitor domains at stage E11.5. Scale bar 100 $\mu$ m.



## Supplementary Methods

### Animals.

*Sema3B-GFP* mice were genotyped with the following set of primers: Sema3Ba, Sema3Bb<sup>12</sup> and GFP-AS (CGCCGATGGGGGTGTTCTGC).

### Conditioned media.

For Sema3B<sup>cm</sup> and GFP<sup>cm</sup>, HEK 293 cells were transfected with plasmids encoding either Sema3B-GFP fusion protein or control GFP protein. For FP<sup>cm</sup>, FPs were isolated from OF1 and Sema3B-GFP KI E12.5 embryos and cultivated in 0.5% low melting agarose (Sigma Aldrich) clots in B27-supplemented Neurobasal medium.

### Dot Blot.

FP<sup>cm</sup> from E12.5 WT and Sema3B<sup>gfp</sup> embryos were spotted onto nitrocellulose membrane and probed with mouse anti-GFP antibody (1/1000, Roche) and anti-IgG mouse Peroxydase (1/5000, Jakson laboratories) diluted in PBS-BSA5%. Membranes were revealed by chemiluminescence with ECL (Biorad).

### *In situ* hybridization.

*In situ* hybridization was carried out on 20µm cryosections from gelatine/sucrose-embedded embryos, as described previously<sup>14,15,16</sup>.

### Immunohistochemistry.

Whole-mounted embryo and 30µm cryostat sections were incubated for 3hrs or 1hr respectively in a blocking solution (2% Bovine Serum Albumin, 0.5% Triton X-100 in PBS)



and incubated with primary antibodies diluted in the blocking solution. The primary antibodies used were a rat anti-phospho-Histone PH3 (Sigma Aldrich), mouse anti- $\gamma$ -tubulin and anti-acetylated tubulin (Sigma Aldrich), mouse anti-GFP (Roche), rabbit anti-ZO1 (Zymed Laboratories), rabbit anti-PKC (Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-Olig2 (Chemicon International), mouse monoclonal anti-Nkx2.2, anti-Nkx6.1 and anti-Pax7 (DSHB). Embryos and section were then incubated with suitable fluorescent secondary antibodies. Secondary antibodies were Texas-red anti-rat (Jackson Immuno-research), Alexa488 anti-mouse and anti-rabbit (Mol. Probes), Fluoprobes 547 anti-mouse (Interchim) and Alexa555 anti-rabbit (Mol. Probes). Cell nuclei were stained with bisbenzimidazole (Promega) and F-actin with TRITC-phalloidin (Sigma Aldrich). Staining was observed under Zeiss LSM510 or Olympus FV1000 confocal microscopes.

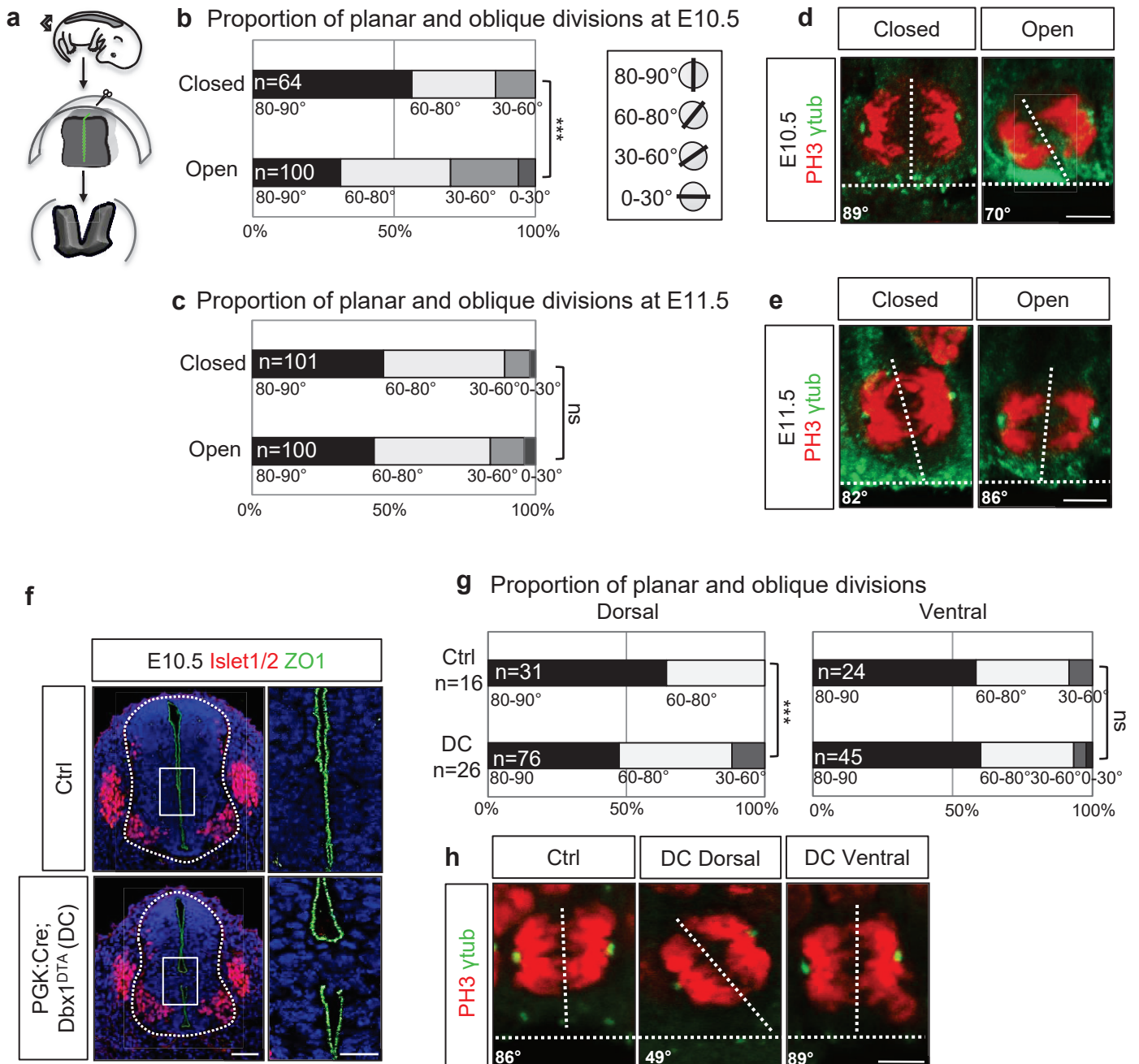
### **Statistical analysis.**

Statistics analyses were performed with the R software. Mann-Whitney U test was used for mitotic index and spinal cord area analyses.  $\chi^2$  test was used for angle distribution and mitotic phase analysis.



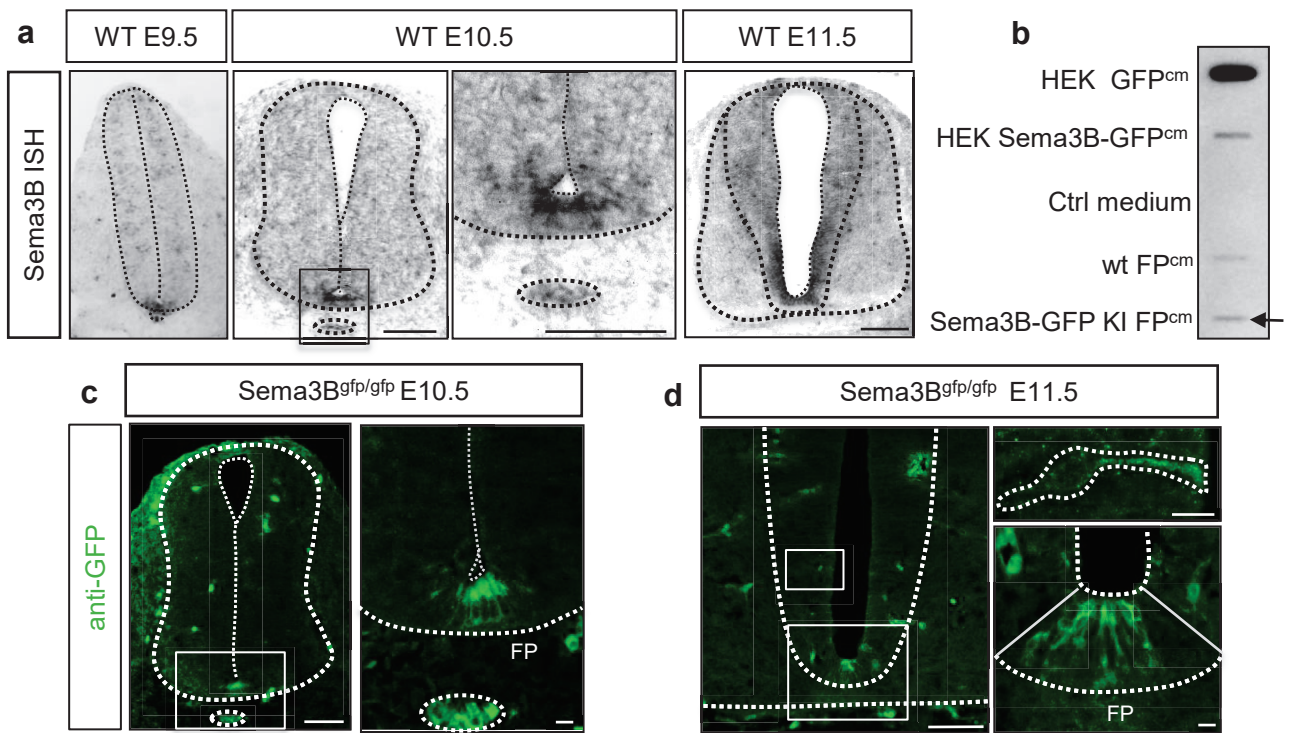


**Figure 1**





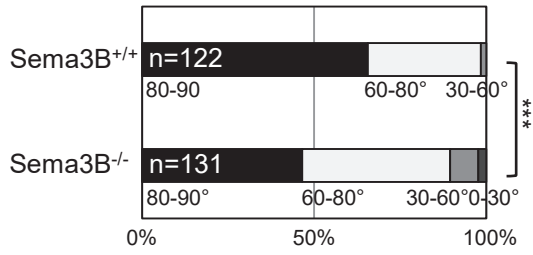
**Figure 2**



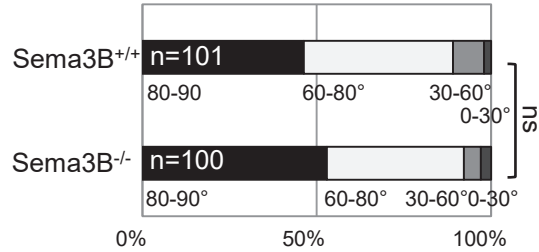


**Figure 3**

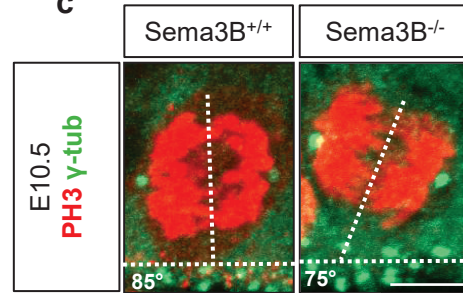
**a** Proportion of planar and oblique divisions at E10.5



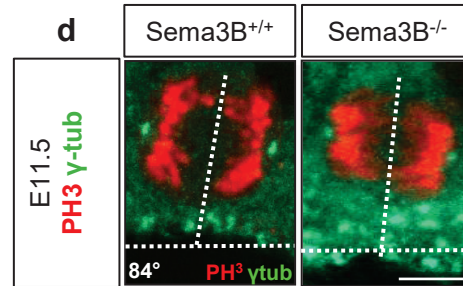
**b** Proportion of planar and oblique divisions at E11.5



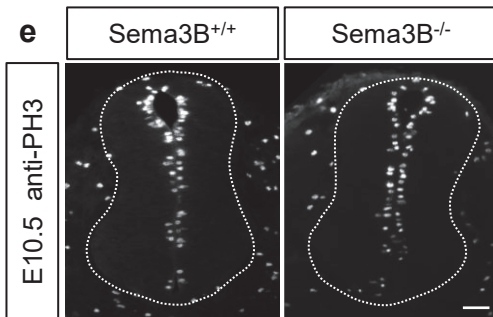
**c**



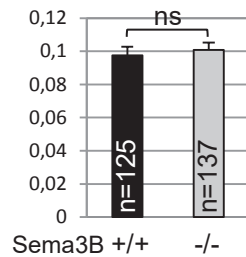
**d**



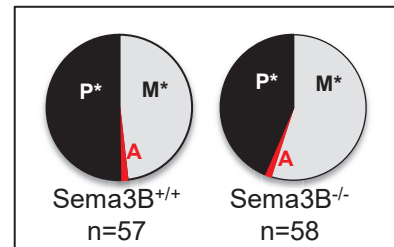
**e**



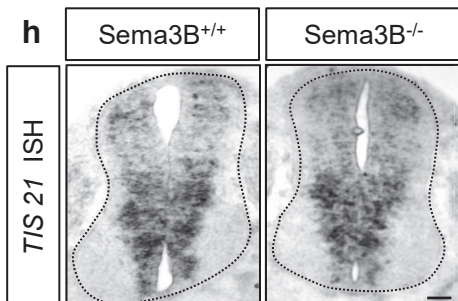
**f** mitotic index



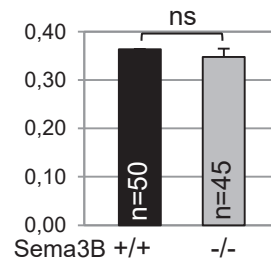
**g** Proportion of Mitosis phase



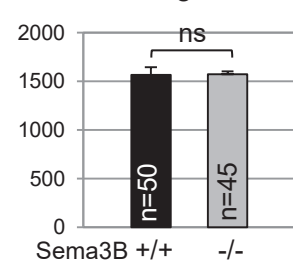
**h**



**i** Tis21 staining area

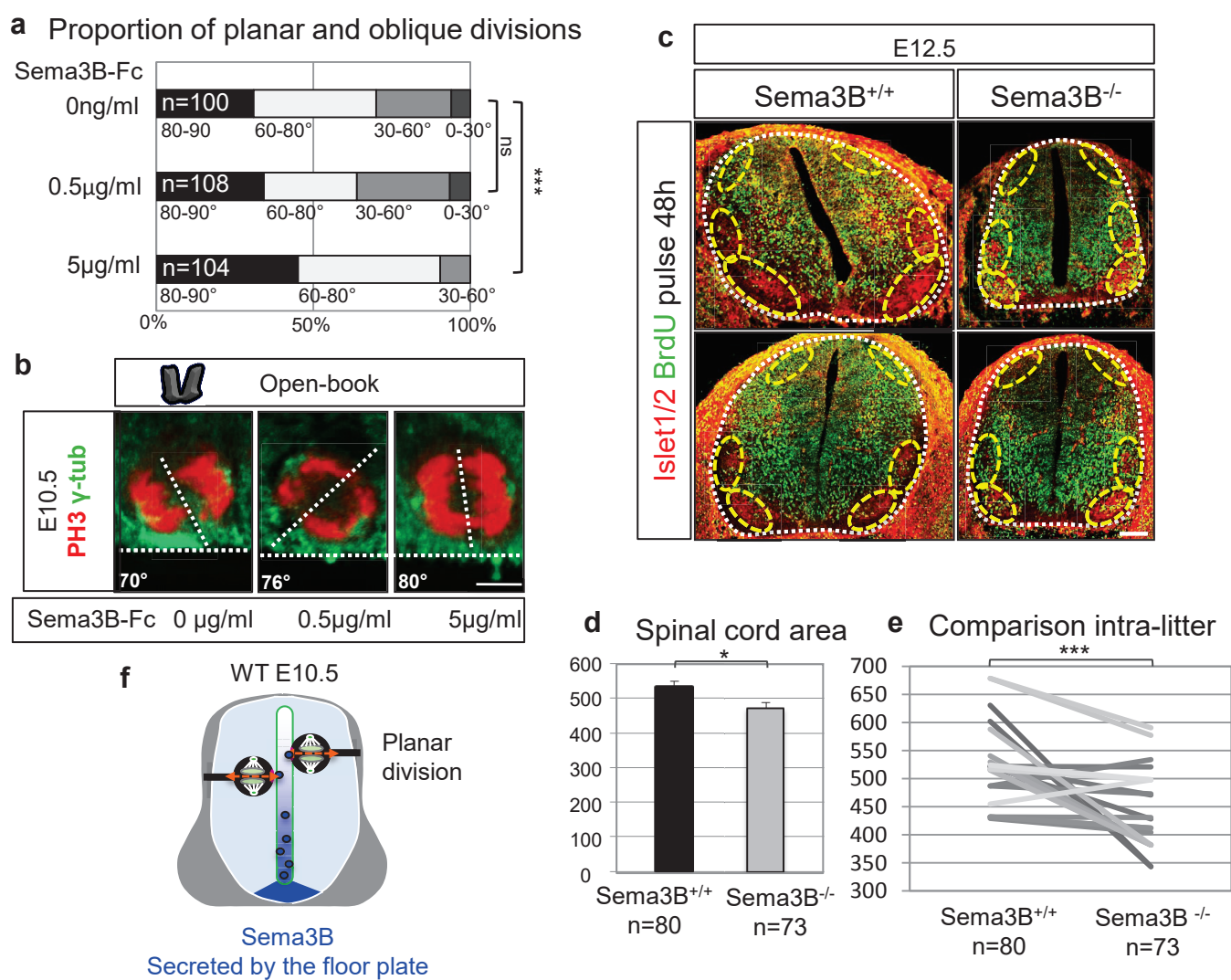


**j** Tis21 staining intensity





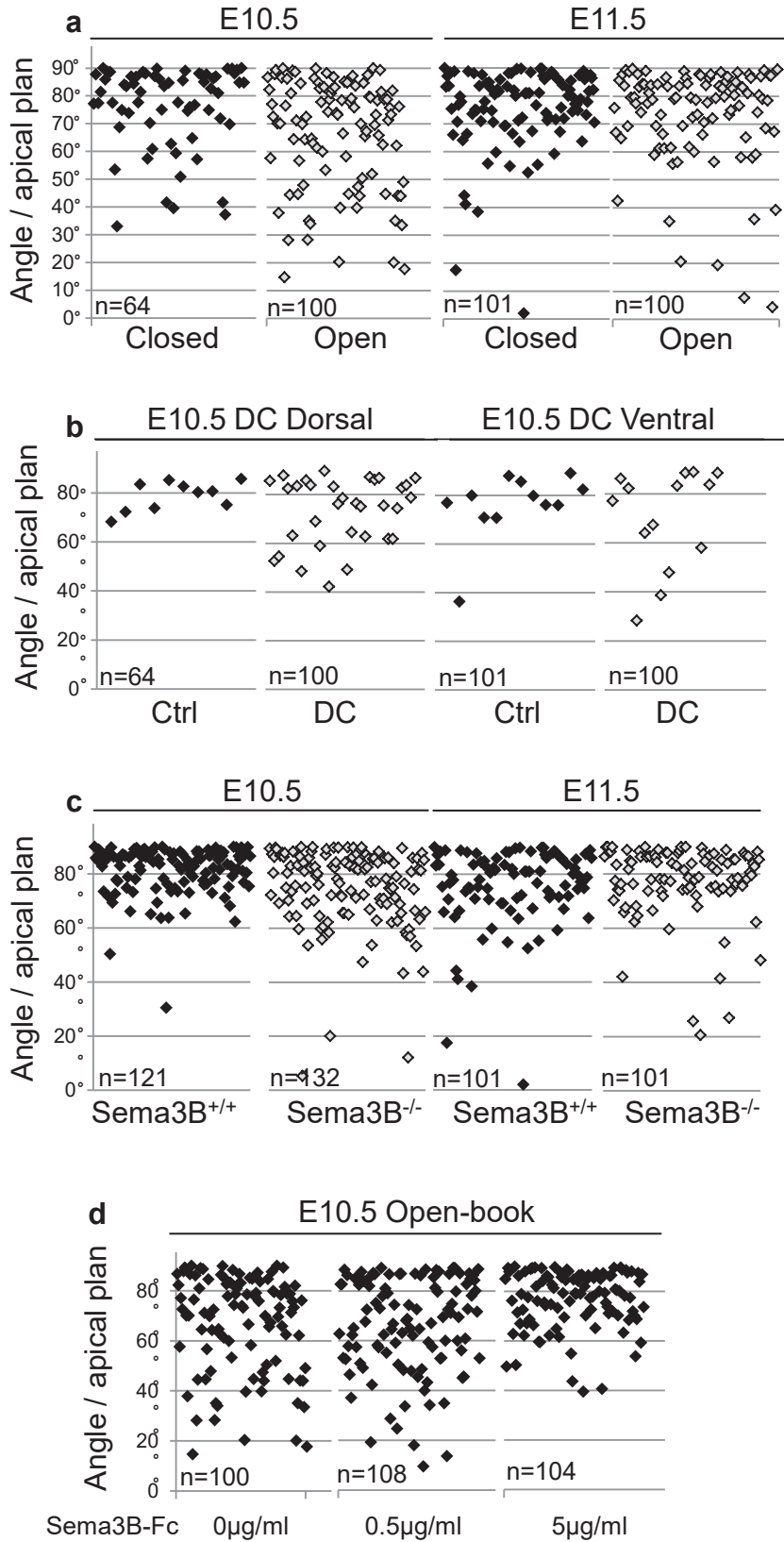
**Figure 4**





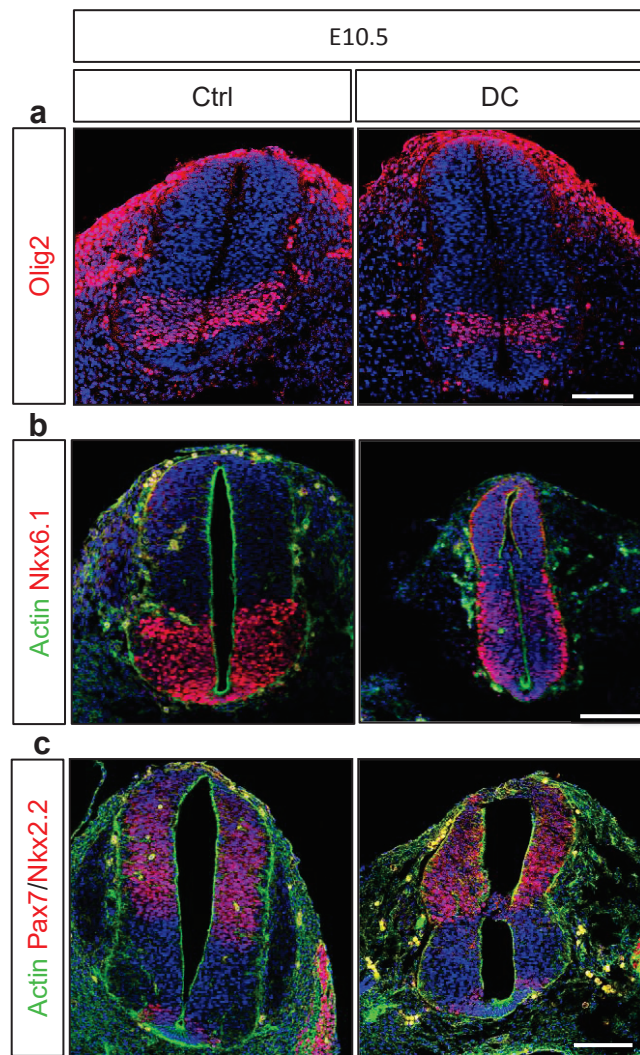


Supplementary Figure 1.





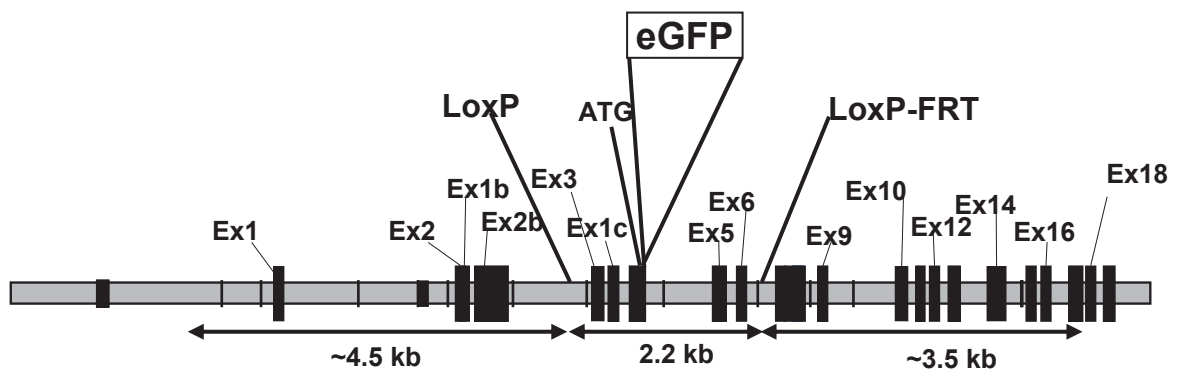
Supplementary Figure 2.





### Supplementary Figure 3.

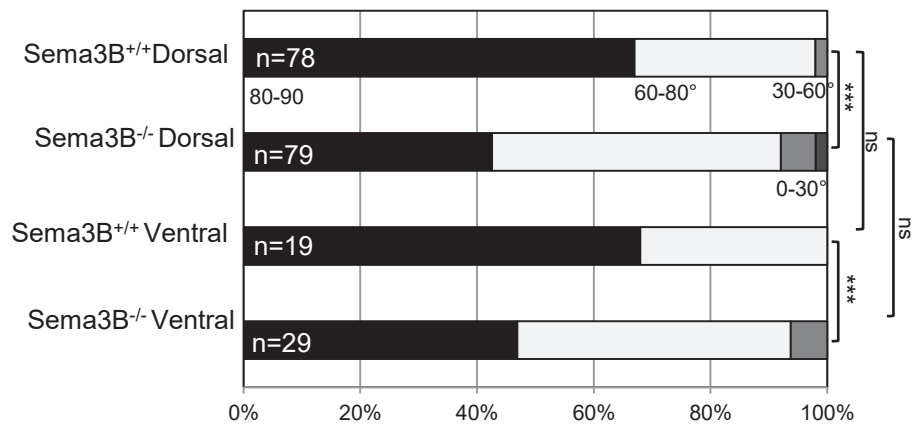
Sema3B-GFP knock-in, conditional KO allele





### Supplementary Figure 4.

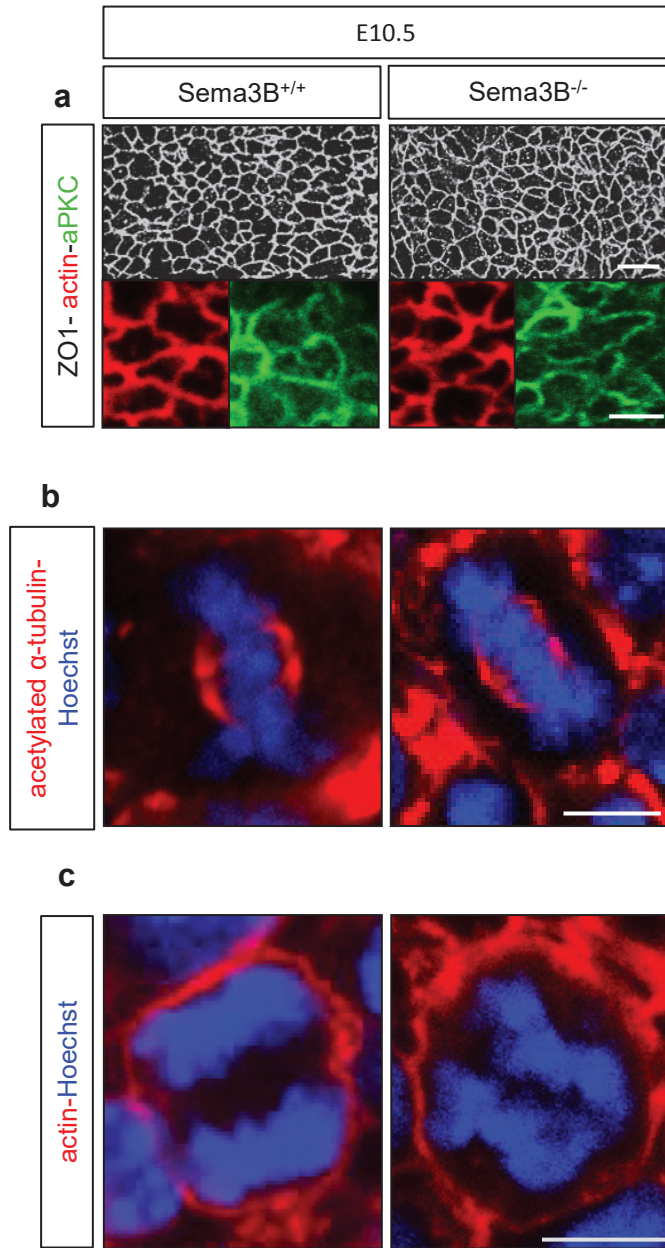
Proportion of planar and oblique divisions at E10.5





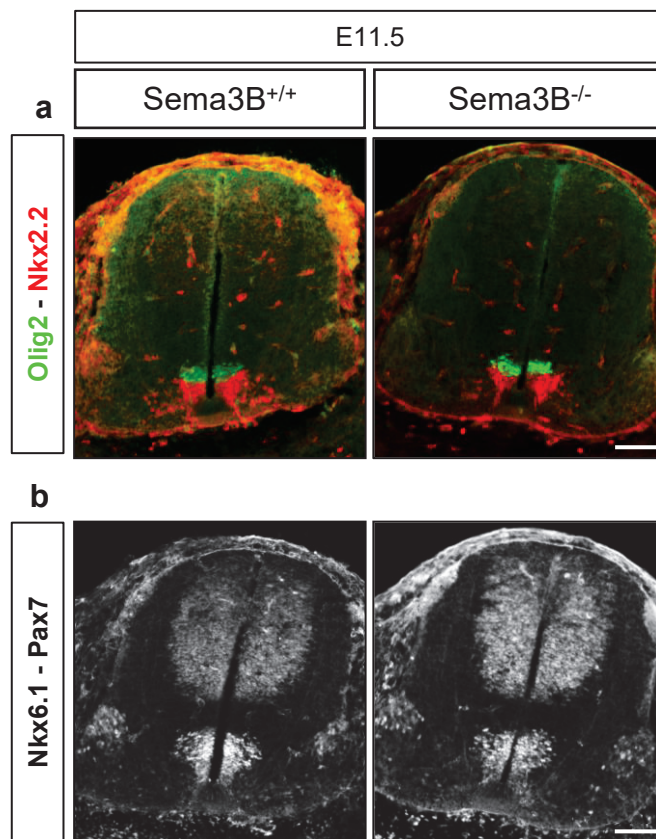


Supplementary Figure 5.





Supplementary Figure 6.





Le matériel et méthodes étant décrit très succinctement dans l'article, le paragraphe ci-dessous apportent des explications détaillées des différents protocoles mis au point et utilisés dans nos expériences.

## **Materials and Methods**

### **Animals.**

Timed pregnant OF1 mice were obtained from Charles River. Mice carrying null alleles for *Sema3B* have been described previously and were genotyped as originally reported in (Falk et al., 2005). (2001). The *Sema3B-GFP KI* allele corresponds to a fusion of the coding sequence of *eGFP* (Clontech) to the Nterminal part of *Sema3B* downstream of the signal peptide. In addition, 2 LoxP sites were inserted in the introns flanking exons 3 and 6 (Supplementary Figure 2). These mice were genotyped with the following set of primers: *Sema3Ba* (GGTGTGGGTGTGTCTCTGATTGTGG), *Sema3Bb* (GCACCAGCAAGTCTTTCCATATCGG) (Falk et al., 2005) and *GFP-AS* (CGCCGATGGGGGTGTTCTGC). *Sema3Ba* and *b* amplified a 432 bp fragment identifying the wild-type allele, while *Sema3Ba* and *GFP-AS* amplified a 927 bp fragment, corresponding to the Knock-in allele. The *PGK:Cre;Dbx1<sup>DTA</sup>* mouse line has been described previously in (Causeret et al., 2011). Briefly, the genetic ablation of *dbx1*-expressing cells was achieved by conditional expression of the diphtheria toxin A fragment (DTA), crossing *Dbx1IRES-loxP-Stop-loxP-DTA* mice (referred to as *Dbx1<sup>DTA</sup>*) with *PGK:Cre* recombinase expressing strains. *PGK:Cre* animals express *Cre* in the germ line, therefore allowing complete ablation of all *dbx1*-expressing cells.

### **BrdU injections.**

Mice were injected at E10.5 and E11.5 of pregnancy with 80mg/kg of BrdU (Sigma Aldrich). After 1h or 48h, embryos were collected and fixed overnight in 4% paraformaldehyde (PFA)



(Sigma Aldrich).

### **Conditioned mediums.**

For Sema3B<sup>cm</sup> and GFP<sup>cm</sup>, HEK 293 cells were grown on plastic dishes in High glucose DMEM with 10% fetal bovine serum (Sigma Aldrich) and 1X penicillin/streptomycin/glutamine (Invitrogen). Cells were transfected with ExGEN 500 (Euromedex), according to the manufacturer's instructions, and plasmids encoding either Sema3B-GFP fusion protein or control GFP protein. The supernatants in Opti-MEM (Gibco) were collected after 48h and concentrated (40X or 60X) Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices (Millipore). For FP<sup>cm</sup>, FPs were isolated from OF1 and Sema3B-GFP KI E12.5 embryos and cultivated in 0.5% low melting agarose (Sigma Aldrich) clots in B27-supplemented (Gibco) Neurobasal medium (Gibco).

### **Dot Blot.**

FP<sup>cm</sup> from E12.5 WT and Sema3B<sup>gfp</sup> embryos were prepared and collected. For dot blot, the conditioned mediums were spotted on a nitrocellulose membrane and probed with mouse anti-GFP antibody (1/1000, Roche) and anti-IgG mouse Peroxydase (1/5000, Jackson laboratories) diluted in PBS-BSA5%. Revelation over film was made by chemiluminescence with ECL (Biorad).

### **"Open book" surgery and incubation.**

OF1 mouse embryos at stage E10.5 and E11.5 were withdrawn from extraembryonic tissues. The neural tube and the overlying epiderm were dorsally cut in «Open-Book» configuration. Embryos were subsequently incubated during 3h in B27/N2-supplemented (Gibco) Neurobasal medium. Closed embryos are used as controls. For rescue experiments, Sema3B-





Fc chimera protein (R&D Systems) was added to the B27/N2-supplemented Neurobasal medium. Embryos were fixed with 4%PFA overnight, cryoprotected in 15% sucrose, then embedded in 7.5%Gelatin/15%Sucrose in PBS for 30  $\mu$ m cryosections.

### ***In situ* hybridization.**

*In situ* hybridization was carried out on 20 $\mu$ m cryosections from gelatine/sucrose-embedded embryos, as described before (Henrique et al., 1995; Moret et al., 2004). Briefly antisense digoxigenin-labeled riboprobes were synthesized from plasmids containing partial cDNA encoding mouse Sema3B, EGFP (Clontech) or mouse Tis21 (Iacopetti et al., 1999), with DIG RNA labeling kit (Roche) (T7 (for Sema3B) and T3 (for EGFP and TIS21) polymerase). Sense probes were used as negative controls. Sections were acetylated in 0.25% acetic anhydride in 0.1 M triethanolamine (pH 8.0). After 1 hour of prehybridization at 65°C, slides were hybridized overnight at 65°C with heat-denatured DIG-labeled RNA probes in a solution of 50% formamide, 1x Denhardt's solution, 10% dextran sulphate, 1 mg/ml baker's yeast tRNA, 0.2 M NaCl, 10 mM phosphate buffer, 10 mM Tris, and 5 mM EDTA pH 7.5). Slides were rinsed twice for 30 minutes at 65°C in 50% formamide, 1x SSC and 0.1% Tween 20, and then washed twice for 30 minutes at room temperature in MABT (0.1 M maleic acid, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 1% Tween 20), blocked for 1 hour in a blocking buffer (2% Blocking reagent (Roche), 20% normal sheep serum), and incubated overnight at room temperature with alkaline phosphatase-coupled anti-DIG antibody (Roche) diluted 1:2,000 in blocking buffer.. The alkaline phosphatase activity was revealed by reaction with the NBT/BCIP (Roche) substrate diluted in a staining buffer (100 mM Tris, pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween 20).

### **Immunohistochemistry.**



For whole-mount embryo immunostaining, embryos were fixed overnight at 4°C with 4%PFA in PBS. They were then cut in two halves along the median plane, Embryos were next rinsed in PBS, (only for  $\gamma$ tubulin staining, embryos were post fixed in acetone at -20°C then rinsed in PBS), incubated for 3h in a blocking solution (2% Bovine Serum Albumin, 0.5%Triton X-100 in PBS) and incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in the blocking solution. After three washes in PBS, 0.1% Triton X-100 (PBST), embryos were incubated overnight at 4°C with suitable fluorescent secondary antibodies, then rinsed, post fixed with 4%PFA, and mounted in Mowiol in MatTek dishes. For immunostaining on sections, 30 $\mu$ m cryostat sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in blocking solution (only for  $\gamma$ tubulin staining, sections were post fixed in acetone at -20°C then rinsed in PBS before blocking), rinsed in PBST and incubated 1h at room temperature with suitable secondary antibodies,. The primary antibodies used were a rat monoclonal anti-phospho-Histone H3 (PH3) (1/50, Sigma Aldrich), a mouse monoclonal anti- $\gamma$ -tubulin (1/100, Sigma Aldrich), a mouse monoclonal anti-GFP (1/100, Roche), a rabbit polyclonal anti-ZO1 (1/100, Zymed Laboratories), a rabbit polyclonal anti-PKC (1/100, Santa Cruz Biotechnology), a mouse monoclonal anti acetylated tubulin (1/100, Sigma Aldrich), a rabbit polyclonal anti-Olig2 (1/100 Chemicon International), a mouse monoclonal anti-Nkx2.2 (1/100, DSHB), a mouse monoclonal anti-Nkx6.1 (1/100, DSHB) and a mouse monoclonal anti-Pax7 (1/100, DSHB). Secondary antibodies were Texas-red anti-rat (1/50, Jackson Immuno-research), Alexa488 anti-mouse (1/500, Mol. Probes), Alexa488 anti-rabbit (1/500, Mol. Probes), Fluoprobes 547 anti-mouse (1/200, Interchim) and Alexa555 anti-rabbit (1/500, Mol. Probes). Cell nuclei were stained with bisbenzimidazole (1/2000, Promega) and F-actin with TRITC-phalloidin (1/500, Sigma Aldrich). Staining was observed under Zeiss LSM510 or Olympus FV1000 confocal microscopes.



## Quantifications.

The mitotic index was calculated as the number of PH3 positive cells normalized by spinal cord diameter along the dorso-ventral axis for each section. The proportion of cells in pro/meta/anaphase was expressed as the percentage of each phase with respect to PH3 positive cells. To determine cell division orientation relatively to the neuroepithelium plane, cells in anaphase were located thanks to PH3 labelling. High magnification 3D stacks were obtained by confocal microscopy. The (x,y,z) coordinates of both  $\gamma$ -tubulin-positive centrosomes (C and C') and 3 points delineating the apical plane (A1, A2 and A3) were measured with ImageJ software. The angle ( $\alpha$ ) between the apical plane and the division plane was then calculated using the following formula. 
$$\cos(\alpha) = \frac{|(x_{C'}-x_C)((y_{A2}-y_{A1})(z_{A3}-z_{A1})-(y_{A3}-y_{A1})(z_{A2}-z_{A1}))+ (y_{C'}-y_C)((x_{A3}-x_{A1})(z_{A2}-z_{A1})-(x_{A2}-x_{A1})(z_{A3}-z_{A1}))+ (z_{C'}-z_C)((x_{A2}-x_{A1})(y_{A3}-y_{A1})-(x_{A3}-x_{A1})(y_{A2}-y_{A1}))}{\sqrt{((y_{A2}-y_{A1})(z_{A3}-z_{A1})-(y_{A3}-y_{A1})(z_{A2}-z_{A1}))^2+((x_{A3}-x_{A1})(z_{A2}-z_{A1})-(x_{A2}-x_{A1})(z_{A3}-z_{A1}))^2+((x_{A2}-x_{A1})(y_{A3}-y_{A1})-(x_{A3}-x_{A1})(y_{A2}-y_{A1}))^2} \sqrt{((x_{C'}-x_C)^2+(y_{C'}-y_C)^2+(z_{C'}-z_C)^2)}$$
. The area of spinal cord transverse sections, the thickness of the ventricular zone and the mantle zone were analyzed with the ImageJ software. The limit between the ventricular and mantle zones was delineated with the BrdU staining after 1h incorporation.

## Statistical analysis.

Statistics analyses were performed with the R software. Mann-Whitney U test was used for mitotic index, spinal cord, VZ and MZ area analyses.  $\chi^2$  test was used for angle distribution and mitotic phase analysis .

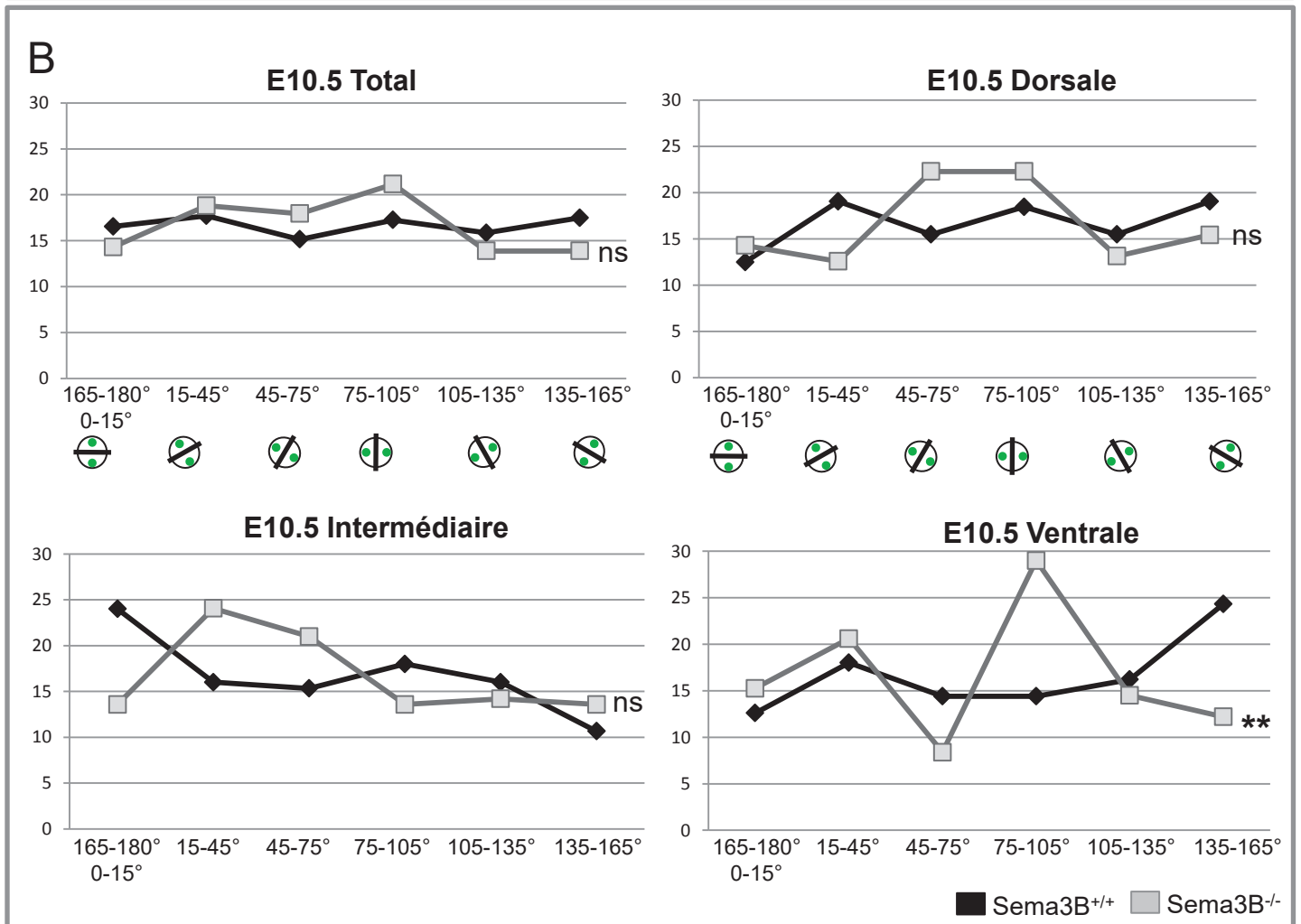
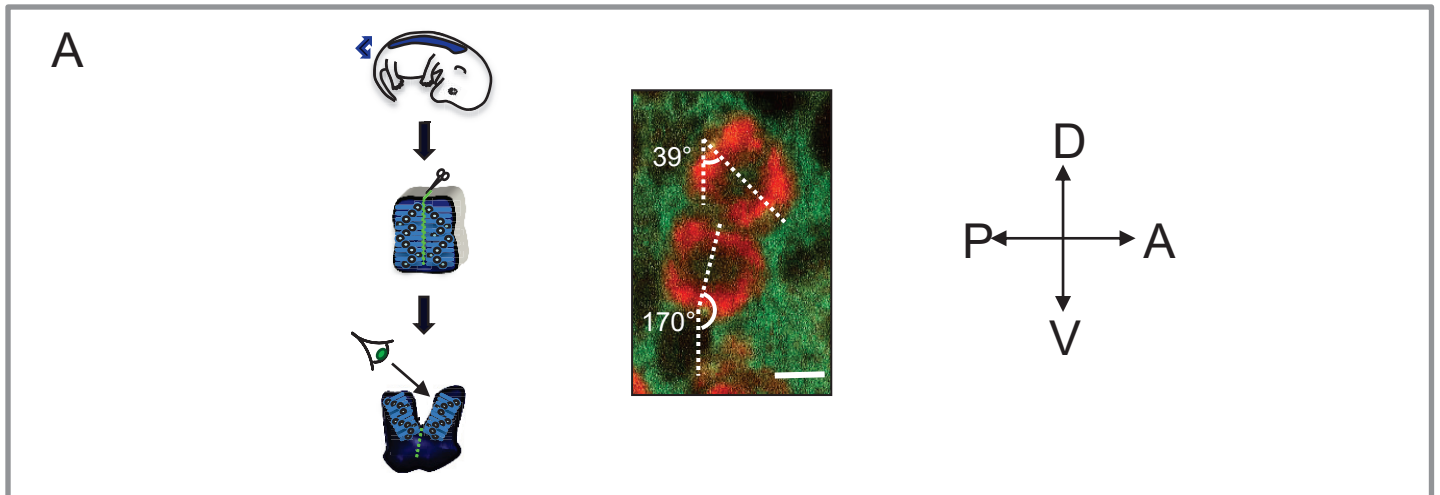


## II. ORIENTATION DES DIVISIONS DES PROGENITEURS NEURAX DANS L'AXE DORSO-VENTRAL ET ANTEROPOSTERIEUR

Lors de l'étude du rôle de la Sémaphorine 3B dans l'orientation des divisions des progéniteurs neurax de la moelle épinière, nous nous sommes initialement intéressés aux déviations du plan de division par rapport à l'axe apico-basal du neuroépithélium, composante des divisions abondamment décrites dans la littérature. J'ai mis en évidence un rôle de la protéine Sema3B dans l'orientation des divisions des progéniteurs spinaux par rapport à cet axe. Dans un deuxième temps je me suis intéressée aux orientations des progéniteurs neurax par rapport aux autres axes de polarité du plan du neuroépithélium, l'axe dorso-ventral et l'axe antéro-postérieur. En effet, dans d'autres contextes développementaux, comme la formation des tubules rénaux chez la souris, la gastrulation chez le poisson zèbre, ou la formation des organes sensoriels (SOP) chez la Drosophile, il a été montré que l'orientation des divisions par rapport à l'axe antéro-postérieur était très contrôlée. De plus, dans certaines situations, l'orientation des divisions planaires a un impact important sur l'élongation des tissus (pour revue voir (Morin and Bellaïche, 2011)). L'élongation du tube neural avec ses changements de courbure ainsi que la formation de ses vésicules, pourrait reposer sur un patron complexe d'orientation des divisions des progéniteurs neurax dans les trois axes embryonnaires. Des contrôles de l'orientation des divisions par rapport à l'axe dorso-ventral pourraient donc être nécessaires pour déterminer précisément la forme finale de la moelle épinière. L'orientation des divisions dans le plan du neuroépithélium a été peu examinée. Les données de la littérature rapportent une étude en time lapse au niveau de la moelle épinière d'embryons de poulet à 3 jours qui suggère une orientation aléatoire du fuseau mitotique par rapport à l'axe antéro-postérieur (Peyre et al., 2011).

Précédemment, nous avons montré que Sema3B est exprimée au niveau de la plaque du plancher entre E10.5 et E12.5. Par analogie à d'autres protéines sécrétées par la plaque du plancher comme Shh, nous avons émis l'hypothèse que la protéine Sema3B pouvait être distribuée selon un gradient ventro-dorsal, ce qui en fait un candidat intéressant de régulation de l'angle de divisions par rapport à cet axe. J'ai donc étudié l'effet de l'inactivation de Sema3B sur ce paramètre.





**Figure 20 : Orientation des divisions des progéniteurs neurax selon l'axe dorso-ventral dans la moelle épinière au stade E10.5.** **A)** Après immunomarquage in toto de PH3 et  $\gamma$ -tubuline sur des embryons Sema3B<sup>+/+</sup> et <sup>-/-</sup>, des images orientées de cellules en anaphase sont acquises en vue planaire apicale au niveau brachial et thoracique. L'angle formé par l'axe passant par les centrosomes avec l'axe dorso-ventral est mesuré comme indiqué sur le schéma. **B)** Les angles calculés sont répertoriés en six classes. Les graphiques représentent les pourcentages de chaque classe au niveau de la moelle entière (Total) ou au niveau d'une partie de la moelle épinière : Dorsale, Intermédiaire ou Ventrale. Les proportions des angles sont perturbées au niveau de la moelle ventrale chez le mutant Sema3B<sup>-/-</sup>. Barre d'échelle, 5 $\mu$ m.

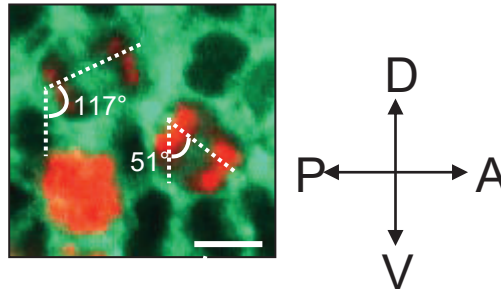
Des immuno-marquages in toto anti-Phospho-Histone 3 (PH3) et anti- $\gamma$ -tubulines ont été réalisés sur des embryons de souris *Sema3B*<sup>+/+</sup> ou <sup>-/-</sup> fixés aux stades E10.5 et E11.5. Les embryons ont été sectionnés en deux selon le plan médian et montés dans des boîtes Mattek de manière à observer la face apicale du neuroépithélium. Après acquisition au microscope confocal des cellules en anaphase, l'angle formé par l'axe passant par les centrosomes dans le repère dorso-ventral et antéro-postérieur a été mesuré avec le logiciel ImageJ. La valeur de cet angle est exprimée entre 0 et 180°. Un angle de 0° correspond à un alignement des centrosomes avec l'axe d-v. (**Figure 20A**). Les cellules ont ensuite été réparties en 6 classes d'angles d'une amplitude de 30°, de 0° à 180° (**Figure 20B. et 21B**).

Si l'on examine le pourcentage de cellules de chaque classe à E10.5 et E11.5 au niveau brachio-thoracique, sans distinction de position, nous observons une distribution équivalente des angles. Afin de savoir si ce résultat global masque des situations locales plus variables, j'ai effectué cette analyse en distinguant 3 régions selon l'axe dorso-ventral: dorsale, intermédiaire et ventrale. Quelle que soit la région considérée, aucune orientation préférentielle des divisions des progéniteurs chez les embryons sauvages n'a été notée. En revanche, chez les embryons *Sema3B*<sup>-/-</sup> à E10.5, nous avons observé une augmentation significative du pourcentage de cellules de la classe 75-105° (plan de division parallèle à l'axe d-v) au niveau ventral de la moelle épinière. En revanche, cette différence n'est plus présente au stade E11.5.

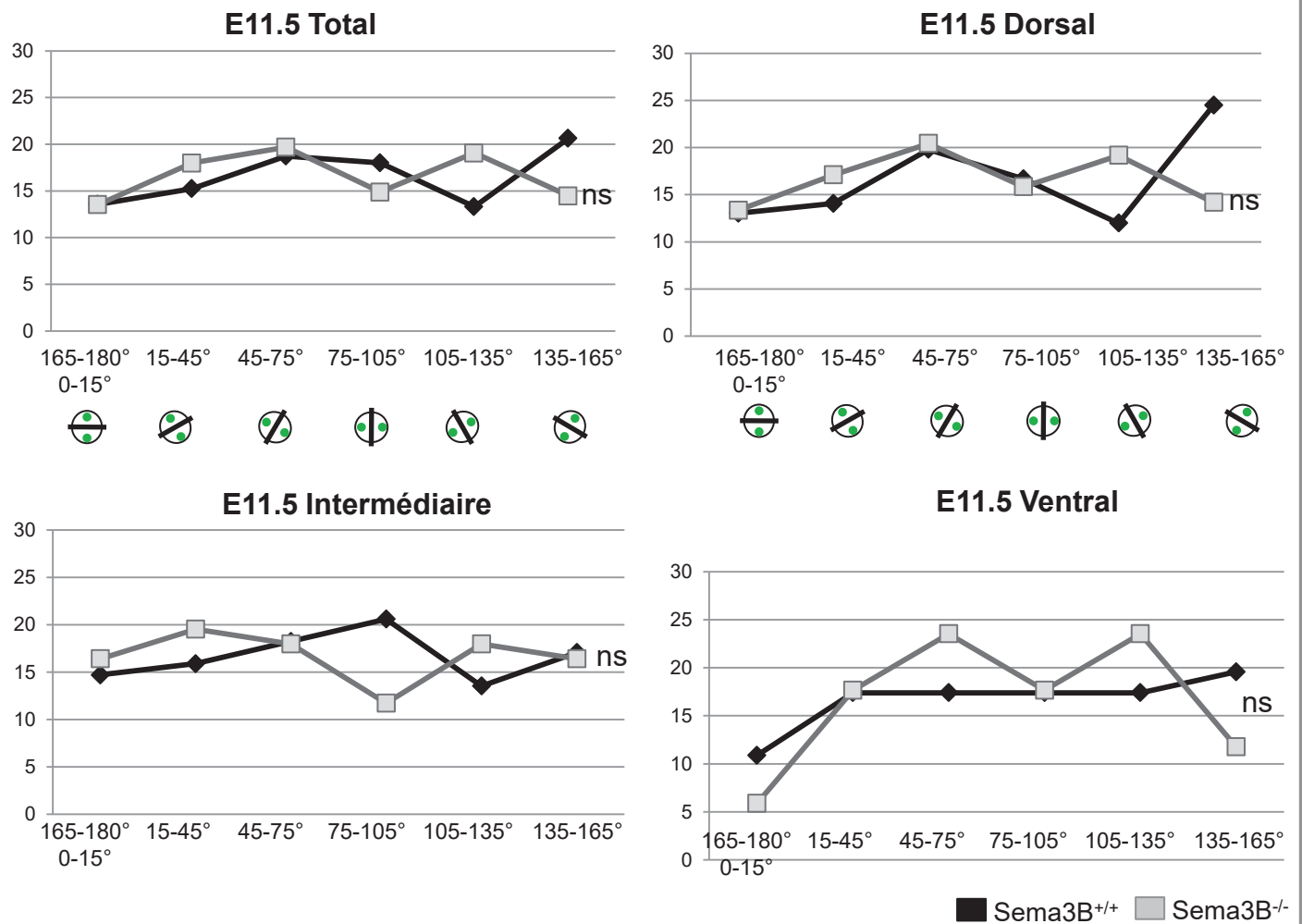
Ces résultats indiquent donc que *Sema3B* contribue à l'orientation des divisions dans les axes dorso-ventral et antéro-postérieurs du neuroépithélium à E10.5. Il est intéressant de constater que ces résultats sont corrélés avec les effets de *Sema3B* sur l'orientation apico-basale des divisions à E10.5. D'autre part, nous pouvons noter que les défauts d'orientation sont détectés au niveau ventral, c'est-à-dire à proximité de la plaque du plancher, la source de sécrétion de *Sema3B* dans le canal central.

En conclusion, ces résultats inattendus suggèrent l'existence d'un contrôle des orientations des divisions des progéniteurs neuraux dans l'axe dorso-ventral et

A

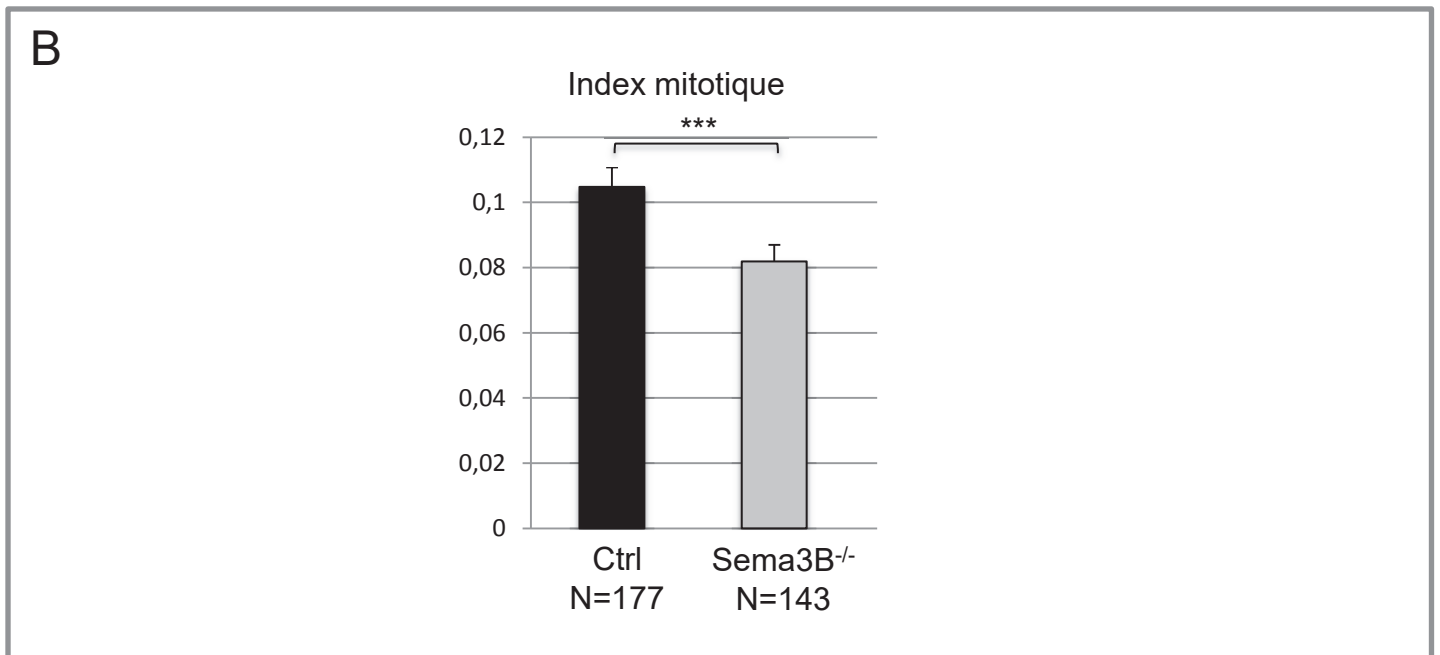
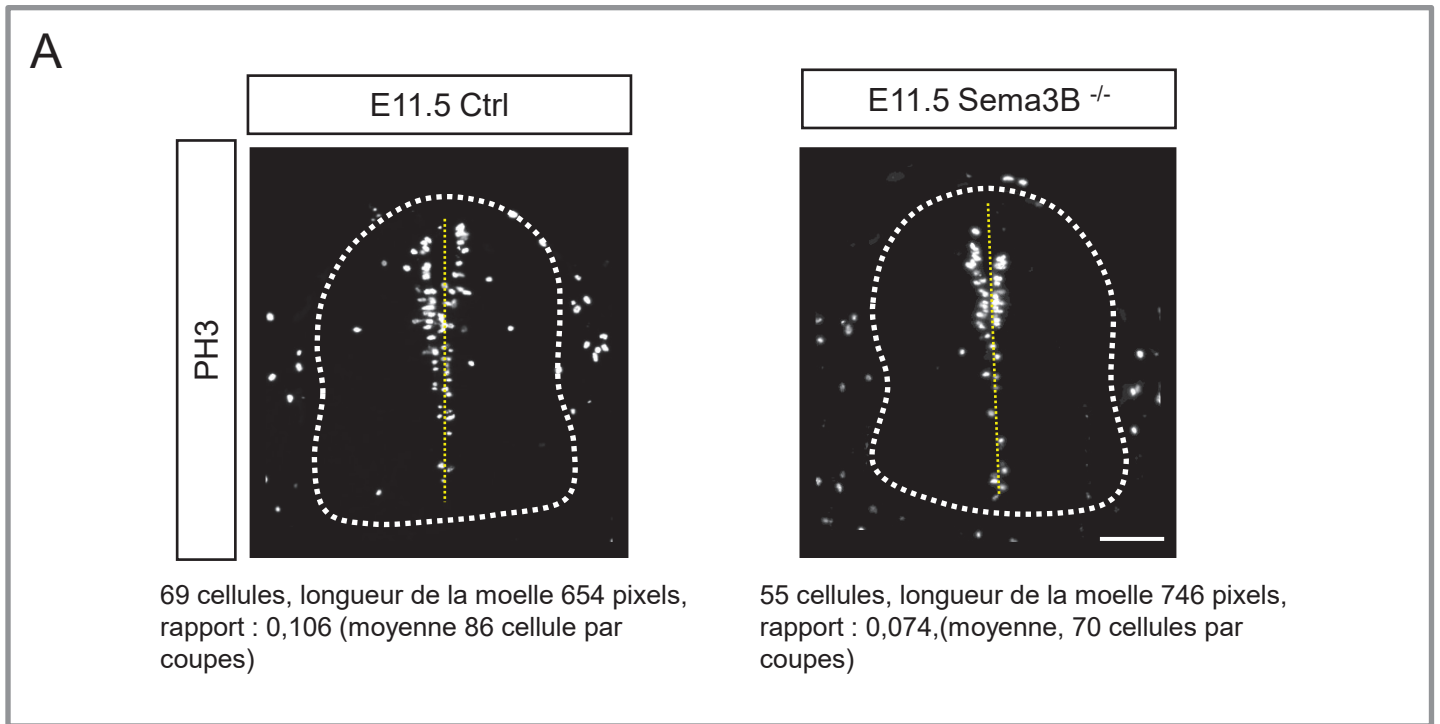


B



**Figure 21 : Orientation des divisions des progéniteurs neuraux selon l'axe dorso-ventral dans la moelle épinière au stade E11.5.** A) Après immunomarquage in toto de PH3 et g-tubuline sur des embryons, des images orientées de cellules en anaphase sont acquises en vue planaire apicale au niveau brachial et thoracique. L'angle formé par l'axe passant par les centrosomes avec l'axe dorso-ventral est mesuré comme indiqué sur le schéma. B) Les angles calculés sont répertoriés en six classes. Les graphiques représentent les pourcentages de chaque classe au niveau de la moelle entière (Total) ou au niveau d'une partie de la moelle épinière : Dorsale, Intermédiaire ou Ventrale. Barre d'échelle, 5µm.

antéro-postérieur auquel contribue le signal Sema3B. Ce contrôle permettrait d'assurer une représentativité équivalente et uniforme du spectre d'orientation des divisions dans l'axe dorso-ventral du tissu. L'absence de Sema3B au stade E10.5 perturberait cette distribution des angles, au niveau des progéniteurs exposés aux fortes concentrations de signal, localisés dans la partie ventrale de la moelle épinière, les amenant à adopter des angles entre 75 et 105°.



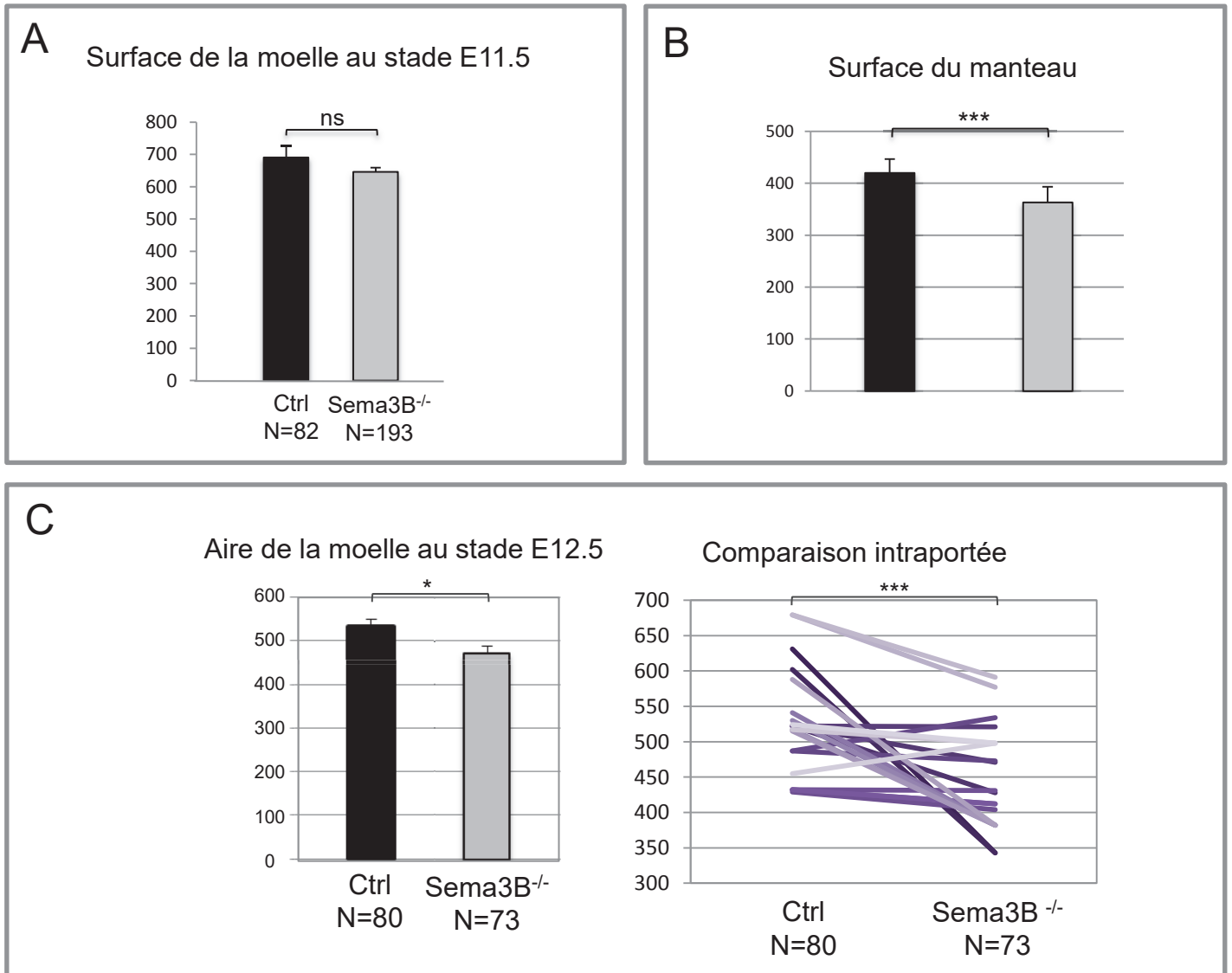
**Figure 22 : Index mitotique chez les embryons Sema3B<sup>+/+</sup> et <sup>-/-</sup>.** **A)** Le nombre de cellules PH3<sup>+</sup> est compté et normalisé par rapport à la hauteur de la moelle épinière. Barre d'échelle, 100µm. **B)** Ce rapport diminue chez la souris Sema3B<sup>-/-</sup> par rapport aux Sema3B<sup>+/+</sup> au stade E11.5 de manière significative.

### III. CONSEQUENCES DE L'INVALIDATION DE LA SEMAPHORINE 3B A DES STADES PLUS TARDIFS DE LA NEUROGENESE

Après la mitose, les progéniteurs neuraux peuvent s'orienter vers deux destins cellulaires, soit rester à l'état progéniteur et résider dans la zone ventriculaire, soit quitter le cycle cellulaire, perdre l'ancrage apical, migrer basalement et se différencier dans la zone du manteau. Les résultats obtenus précédemment montrent que la présence de la Séma3B dans le canal central promeut l'orientation planaire des divisions. De nombreuses études se sont intéressées aux conséquences de l'altération des angles de division au niveau du destin des cellules filles engendrées au cours de la neurogenèse. Ces études ont conduit à des conclusions contradictoires, certaines appuyant l'idée d'un effet de l'angle de division sur le destin symétrique ou asymétrique des cellules filles, d'autres ne confirmant pas cette hypothèse (Chenn and McConnell, 1995; Morin et al., 2007). Pour apporter de nouvelles données à cette question, nous avons démarré plusieurs analyses dans le but d'examiner les conséquences de l'inactivation de Sema3B sur la prolifération et la neurogenèse à des stades plus tardifs, les stades E11.5 et E12.5. Aussi, nous allons rappeler dans cette partie des résultats déjà présentés dans la partie I. de ces résultats, afin d'obtenir une compréhension plus globale de ces conséquences.

#### 1. Prolifération des progéniteurs spinaux et morphogénèse de la moelle épinière

Nous avons montré précédemment que l'inactivation de Sema3B n'avait pas d'effet sur l'index mitotique des progéniteurs spinaux à E10.5. De plus nous n'avons pas observé d'altération de la taille de la moelle épinière à ce stade. Ces résultats indiquent que la prolifération de ces progéniteurs n'était pas affectée jusqu'au stade E10.5. J'ai cherché à savoir si le taux de prolifération des progéniteurs neuraux au niveau de la moelle épinière était modifié chez les mutants KO Sema3B à E11.5, c'est-à-dire le jour suivant l'altération des orientations de divisions chez ces mutants.



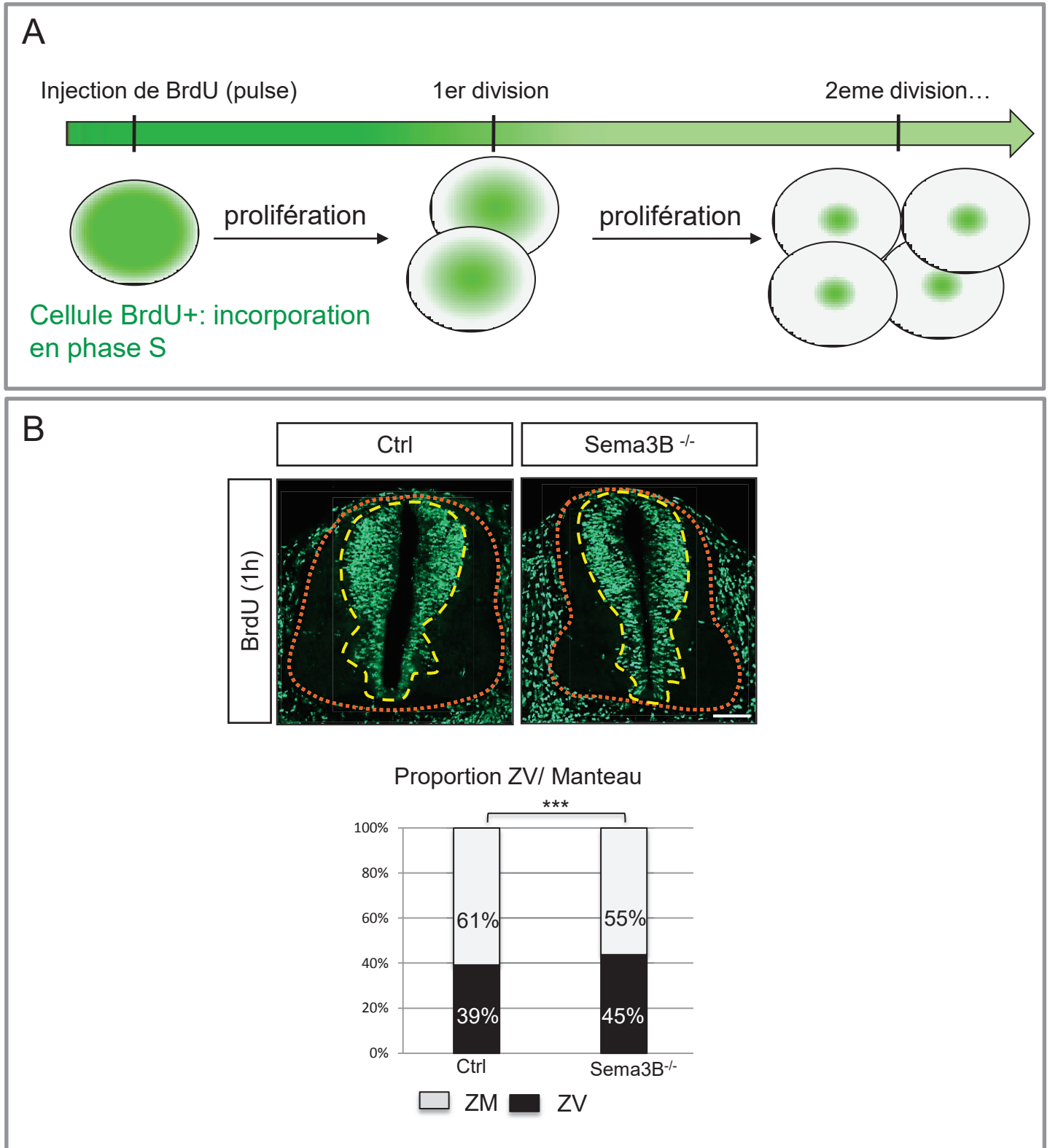
**Figure 23: Surface de la moelle aux stades E11.5 et E12.5. A) et B) Surface de la moelle et du manteau au stade E11.5. C) Surface de la moelle au stade E12.5 et chez les embryons Sema3B<sup>+/+</sup> et <sup>-/-</sup>.**

Par des immuno-marquages anti-PH3 réalisés sur des coupes cryostat d'embryons de souris, nous avons analysé la localisation et le nombre de cellules en mitose au niveau de la zone ventriculaire de la moelle épinière (**Figure 22A**). Nous avons observé une diminution d'environ 20% de l'index mitotique chez les embryons *Sema3B*<sup>-/-</sup> par rapport aux embryons sauvages. Cette diminution concerne de manière similaire les régions dorsales et ventrales de la zone ventriculaire (données non montrées). Ces résultats indiquent donc que le nombre de progéniteurs en mitose est réduit à E11.5 en absence de *Sema3B* (**Figure 22B**)

Des études ont montré que la perturbation de la fonction de protéines impliquées dans l'orientation du fuseau mitotique pouvaient conduire à une perte de des ancrages apicaux par des progéniteurs cyclants et à leur localisation ectopique dans la zone du manteau (Morin et al., 2007). Nous avons examiné si l'augmentation du pourcentage de divisions obliques se traduit par la présence ectopique de progéniteurs en prolifération dans le manteau, pouvant expliquer la perte de cellules en mitose au pôle apical de la zone ventriculaire. De rares cellules PH3<sup>+</sup> sont observées au niveau basal de la zone ventriculaire et dans le manteau des embryons sauvages. Or, ce nombre n'est pas augmenté chez les mutants *Sema3B*<sup>-/-</sup>. Ces résultats indiquent donc que l'intégrité du neuroépithélium n'est pas significativement altérée ni par l'invalidation de *Sema3B* ni par l'excès de divisions obliques observées à E10.5. De plus, la perte de cellules en mitose au niveau de la zone ventriculaire chez le mutant *Sema3B*<sup>-/-</sup> n'est pas due à une localisation ectopique de ces cellules.

L'altération des angles de division à E10.5 suivie par une réduction du nombre de progéniteurs neuraux en mitose à E11.5 pourrait conduire à une diminution de la taille de la moelle épinière aux stades ultérieurs. Pour tester cette hypothèse, nous avons mesuré l'aire occupée par une section de moelle épinière sur des coupes transversales chez des embryons *Sema3B*<sup>+/+</sup> et <sup>-/-</sup>. A E11.5, aucune variation significative de la taille de la moelle épinière n'a été observée (**Figure 23A**). Par ailleurs, une légère réduction de la taille globale du manteau relativement à la ZV est détectée dans la condition *Sema3B*<sup>-/-</sup> (**Figure 23B et Figure 24B**). De plus, de manière intéressante, au stade E12.5, nous avons détecté une nette diminution de la taille de la moelle épinière des embryons *Sema3B*<sup>-/-</sup> par rapport aux *Sema3B*<sup>+/+</sup> de la





**Figure 24 : Surface du manteau.** **A)** Principe des injections de BrdU : le BrdU s'incorpore dans l'ADN pendant la réplication, en phase S. A chaque cycle réplication/division, la quantité de BrdU héritée par les cellules filles est divisée par 2. **B)** La surface du manteau et de la zone ventriculaire sont définies grâce un pulse de BrdU d'une durée d'une heure. 1h après l'injection de BrdU, les cellules BrdU+ ne sont pas sorties du cycle cellulaire et sont restreintes à le ZV. Elles définissent la zone ventriculaire de la moelle épinière, ce qui permet de mesurer la surface du manteau et ainsi d'effectuer le ratiom ZV/ZM. Barre d'échelle 100µm.

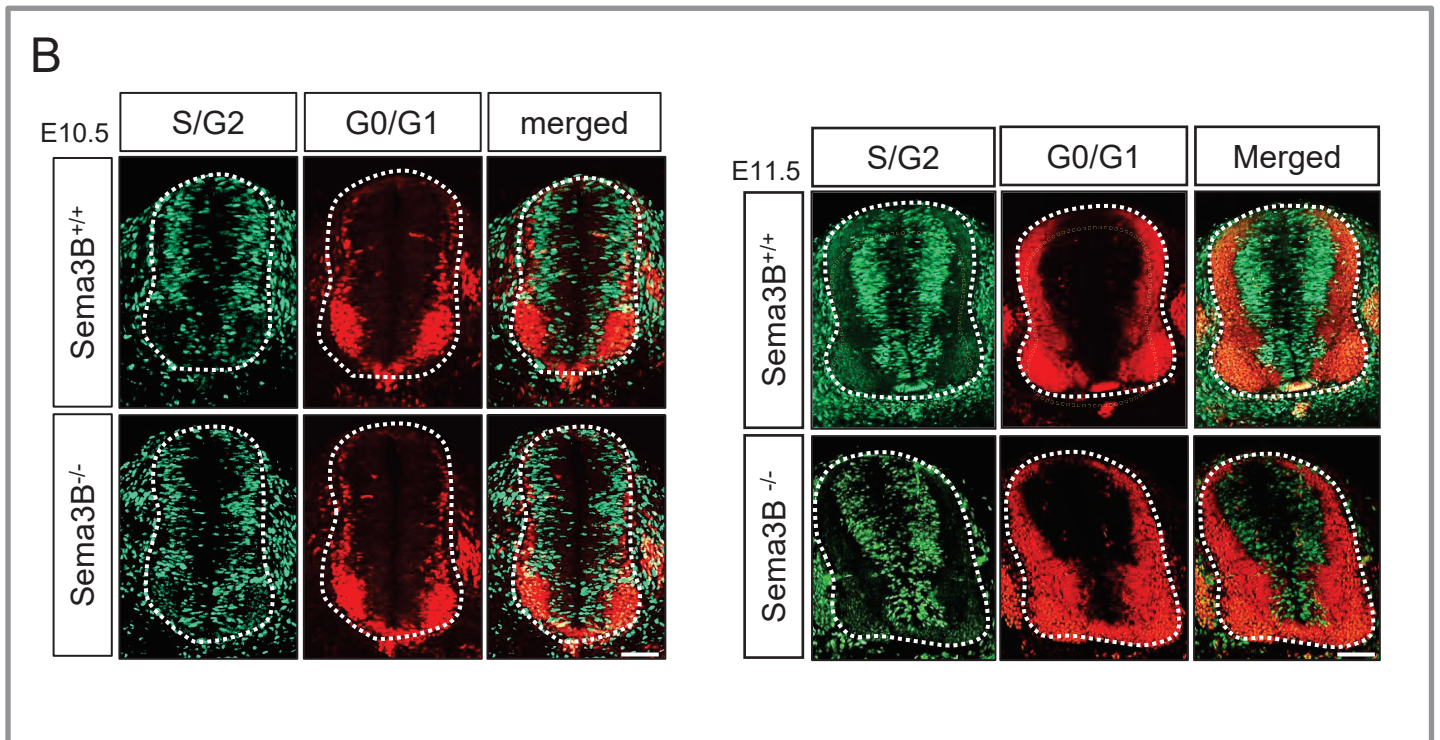
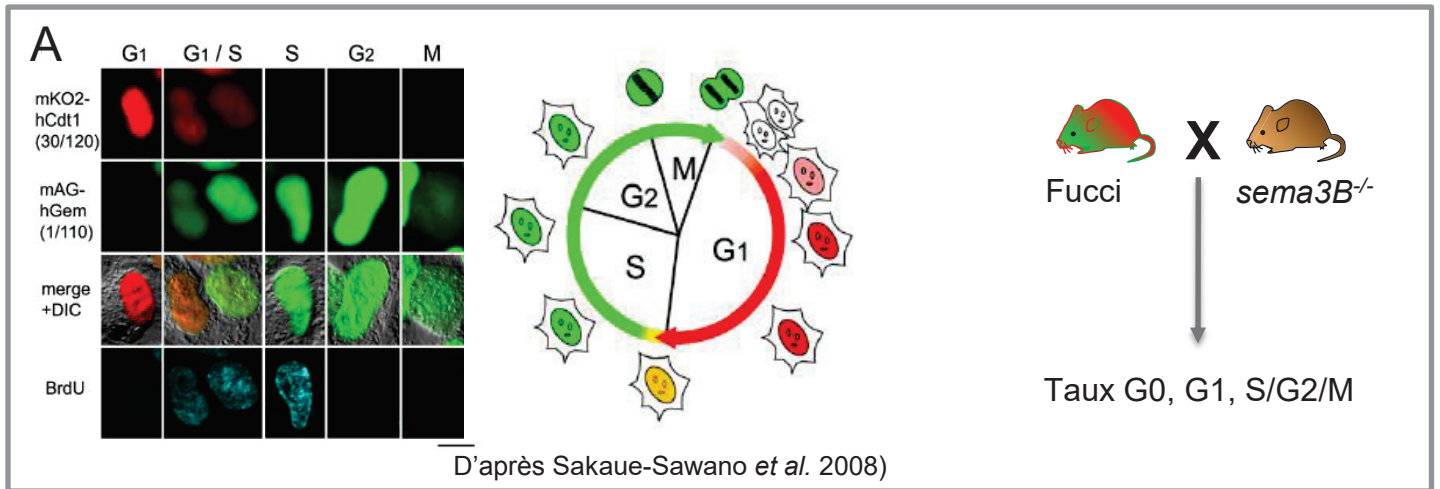
même portée (**Figure 23C**). Nous pouvons aussi noter que l'épaisseur du manteau est fortement réduite dorsalement (**voir plus loin 4. et Figure 27**). Ces résultats montrent donc que l'inactivation de Sema3B provoque une diminution du taux de prolifération des progéniteurs neuraux à E11.5 se traduisant par une moindre croissance de la moelle épinière.

## **2. Morphologie de la zone ventriculaire**

Le nombre de progéniteurs en mitose diminuant en l'absence de Sema3B, nous avons voulu savoir si ce phénotype est dû à une diminution de la population globale des progéniteurs ou à une altération de leur cycle cellulaire (ralentissement ou blocage d'une phase du cycle, sortie du cycle cellulaire en G0) à ce stade de développement.

### **a. Taille de la zone ventriculaire**

Nous avons dans un premier temps évalué la taille de la zone ventriculaire occupée par les progéniteurs en prolifération. Pour cela, nous avons eu recours à la technique de marquage des cellules en phase S par incorporation de BrdU. Le BrdU a été injecté en intrapéritonéal dans des souris gestantes à E11.5 (**Figure 24A**). Les embryons ont été fixés après une heure d'incorporation. Des immuno-marquages anti-BrdU ont été effectués sur des coupes d'embryons pour révéler les cellules en phase S (**Figure 24B**). Ces cellules se trouvant en bordure basale de la zone ventriculaire, ce marquage permet de définir précisément la frontière entre zone du manteau et zone ventriculaire. Nous n'avons pas détecté de variation significative de l'aire occupée par la zone ventriculaire sur des coupes entre embryons Sema3B<sup>+/+</sup> et <sup>-/-</sup>, suggérant que le nombre global de progéniteurs neuraux et leur répartition ne sont pas réduits par l'inactivation de Sema3B à E11.5.



**Figure 25 : Effet de l'inactivation de Sema3B sur la mise en place de la zone du manteau. A)** Principe de la souris *Fucci* : cette lignée contient 2 transgènes codant la protéine Cdt1 fusionnée à la mKO2 (protéine à fluorescence orange Kusabira) et la Géminine fusionnée à la mAG (protéine fluorescence verte Azami). Les cellules en G0 présentent un fort taux de Cdt1-mKO2+ (en rouge vif) et en G1 un taux faible de Cdt1-mKO2+ (en rouge faible). Les cellules en S/G2/M sont Géminine-mAG+ (en vert). Lors de la transition G1/S les cellules expriment les deux protéines (en jaune). En fin de mitose, les cellules ne sont plus visibles. **B)** Les rapporteurs *Fucci* ont été analysés en contexte *Sema3B*<sup>-/-</sup> et <sup>+/+</sup> au stade E10.5 et E11.5. La surface du manteau est définie grâce aux cellules en G0 très fortement marquées en rouge. (n=2 embryons pour la condition contrôle et mutante au stade E10.5, 4 embryons *Sema3B* <sup>+/+</sup> et 6 *Sema3B* <sup>-/-</sup> au stade E11.5). Barre d'échelle 100µm.

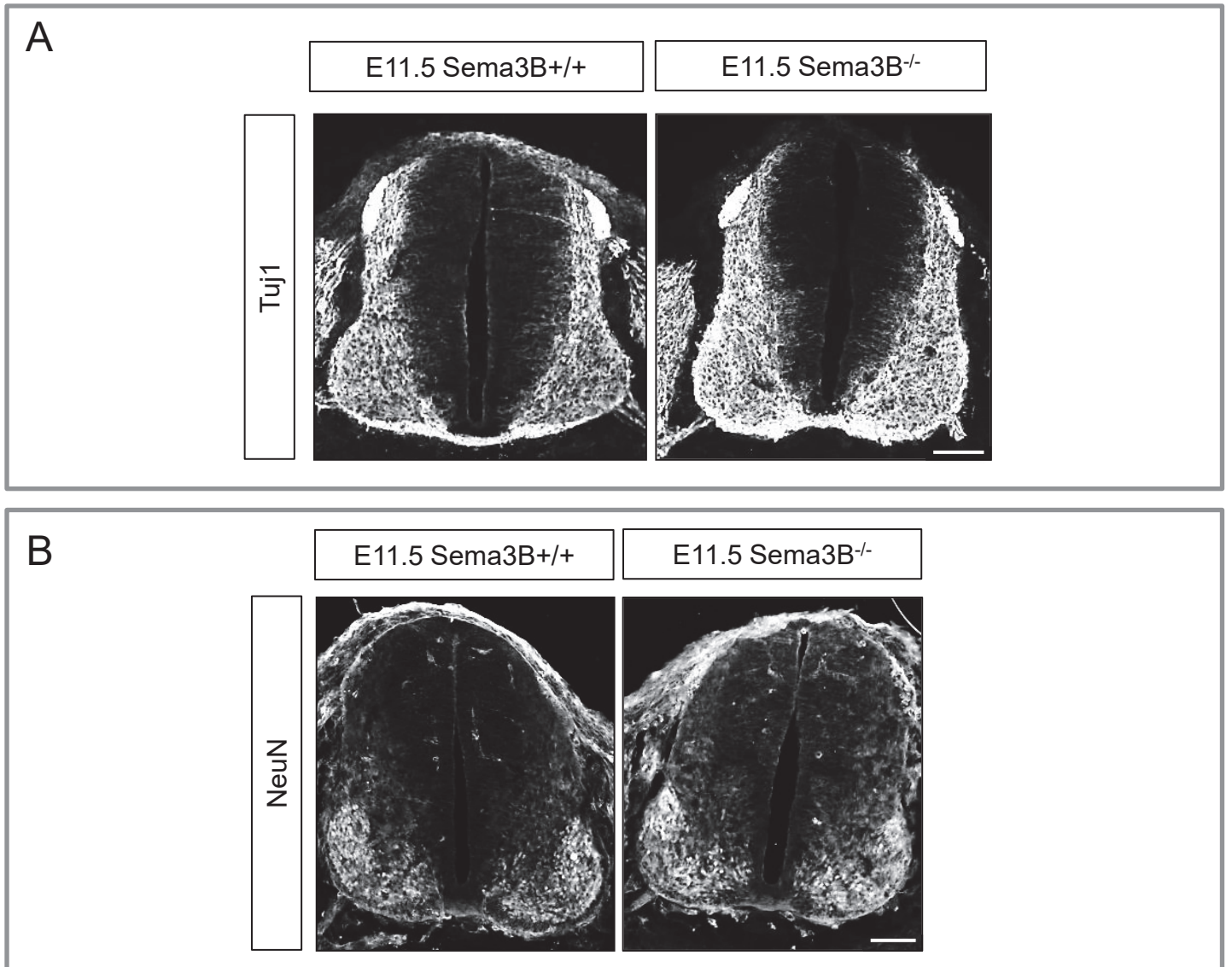
## b. Distribution des cellules cyclantes et post-mitotiques.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu savoir si le déficit de progéniteurs neuraux en mitose observé sans altération de taille de la ZV chez le mutant *Sema3B*<sup>-/-</sup> pouvait être dû à un allongement de certaines phases du cycle cellulaire, d'une sortie prématurée de progéniteurs du cycle cellulaire ou d'un allongement du temps de résidence des précurseurs neuronaux post-mitotiques dans la ZV. Pour répondre à cette question, nous avons voulu tirer parti du système de rapporteurs *Fucci* développé par Sakaue-Sawano et collaborateurs (Sakaue-Sawano et al., 2008).

Les souris *Fucci* contiennent deux transgènes, l'un exprimant une fusion entre une protéine à fluorescence rouge (mKO2, une version monomérique de la Kusabira orange) et Cdt1 une protéine stabilisée dans les cellules en phase G1 et G0, l'autre transgène exprimant une fusion entre une protéine à fluorescence verte (mAG: version monomérique d'Azami verte) et la Géminine stabilisée dans les cellules en phase S et G2. Ces rapporteurs permettent de révéler de manière spécifique les cellules en phase G1/G0 ou en S/G2. Nous avons croisé ces souris *Fucci* avec la lignée KO *Sema3B* pour générer des embryons *Fucci-Sema3B*<sup>-/-</sup> (**Figure 25A**). Nous avons ensuite analysé le patron des fluorescences verte et rouge sur des coupes d'embryons *Sema3B*<sup>+/+</sup> et <sup>-/-</sup> réalisées aux stades E10.5 et E11.5 (**Figure 25B**).

Lors des premières observations, nous avons observé que la fluorescence rouge des progéniteurs en G1 était très faible, rendant impossible une quantification sur cette phase du cycle cellulaire. En revanche, les cellules en G0 présentait une très forte intensité de fluorescence rouge, ce qui a permis de les distinguer très clairement des cellules en G1. La visualisation de la fluorescence verte des cellules en S/G2 a nécessité une optimisation des paramètres d'acquisition.

L'analyse des rapporteurs *Fucci* à E10.5 n'a pas montré de différences évidentes du nombre ou de la position des progéniteurs neuraux de la moelle aux différentes phases (**Figure 25B**). A E11.5, la distribution des progéniteurs en S/G2 des moelles épinières *Sema3B*<sup>-/-</sup> ne présente pas de différences profondes avec les *Sema3B*<sup>+/+</sup>. En revanche, le patron des cellules en G0 au niveau ventral de la moelle



**Figure 26 : Effet de l'invalidation de Sema3B sur la mise en place des cellules post-mitotiques dans la moelle épinière à E11.5. A.** Images d'un immuno marquage anti-Tuj1, chez le contrôle et le mutant Sema3B<sup>-/-</sup>. **B.** Image d'un immunomarquage NeuN chez le contrôle et le mutant Sema3B<sup>-/-</sup>. Barre d'échelle, 100µm.



épinière est modifié dans la condition  $Sema3B^{-/-}$  (n=6/6 embryons). En effet, une accumulation anormale de cellules en G0 en bordure basale de la zone ventriculaire ventrale est observée chez les embryons  $Sema3B^{-/-}$  (**Figure 25B**).

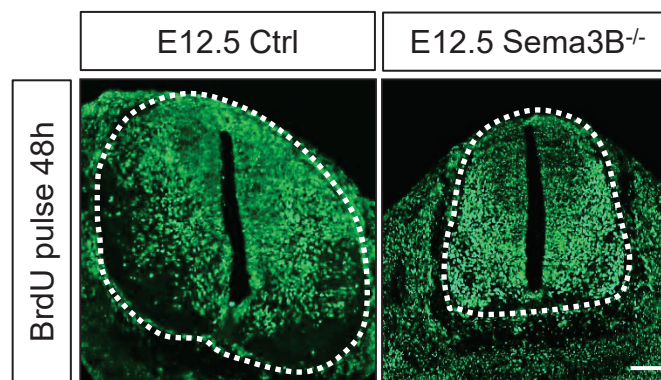
Pour savoir si ces cellules G0 en excès pouvaient être des précurseurs neuronaux récemment sortis du cycle cellulaire ou des neurones différenciés ectopiques, nous avons effectué des immuno-marquages sur des cryosections d'embryon au stade E11.5 avec des anticorps dirigés contre la tubuline  $\beta$ III exprimée (marqueur Tuj1), un marqueur cytoplasmique de la différenciation précoce des neurones post-mitotiques (**Figure 26A**) et contre NeuN, un marqueur nucléaire tardif des neurones différenciés (**Figure 26B**). L'immuno-marquage NeuN ne révèle pas de neurones différenciés ectopiques au niveau de la ZV ventrale chez les embryons  $Sema3B^{-/-}$ , dans la région d'accumulation de cellules en G0. De manière intéressante, une augmentation de la densité du marquage tubuline  $\beta$ III est détectée au niveau de la zone ventriculaire chez les embryons  $Sema3B^{-/-}$  par rapport aux embryons  $Sema3B^{+/+}$ .

Bien que ces résultats nécessitent une confirmation par une quantification sur un nombre d'animaux plus importants, ils suggèrent que l'invalidation de  $Sema3B$  conduirait à un accroissement du nombre de cellules sortant de cycle cellulaire à E11.5 dans la partie ventrale de la moelle ou à un retard dans leur migration dans la zone du manteau.

Enfin, l'étude des marqueurs Fucci, NeuN,  $\beta$ III tubuline n'a pas permis de mettre en évidence de défauts évidents au niveau dorsal de la moelle épinière.

### **3. Devenir des progéniteurs neuraux entre E10.5 et E12.5**

Les résultats précédents obtenus au stade E11.5 montrent que l'invalidation de  $Sema3B$  entraîne une diminution du nombre de cellules en mitose dans la zone ventriculaire spinale, ainsi qu'une altération de la distribution des cellules en G0 et de la tubuline III, marqueur de différenciation précoce, au niveau ventral. Pour expliquer ces défauts nous pourrions émettre l'hypothèse qu'une perturbation du destin des



**Figure 27 : Comparaison de l'épaisseur des moelles à E12.5 entre embryons contrôles et invalidés pour Sema3B.** **A.** Images confocal du marquage BrdU sur des embryons contrôles et Sema3B<sup>-/-</sup> provenant de souris ayant subi un pulse de BrdU (injection à E10.5 et sacrifice à E12.5). La taille de la moelle diminue et le patron de distribution des cellules BrdU<sup>+</sup> est altéré chez le mutant Sema3B. Barre d'échelle 100µm. **B.** Quantification de l'aire de la moelle. En regroupant toutes les données obtenues, la surface de la moelle diminue de manière significative. Les résultats sont encore plus concluants si les données obtenues sont traitées en prenant en compte le critère intraportée. Nous observons alors des mutants Sema3B très touchés par le phénotype de la diminution de la taille de la moelle. . La gravité du phénotype phénotype généré par absence de Sema3B est donc variable.

progéniteurs neuraux générés a lieu entre E10.5 et E11.5. Un nombre excessif de progéniteurs quitterait le cycle cellulaire et s'engagerait dans la différenciation neuronale, au niveau ventral. Pour tester cette hypothèse, nous avons marqué les progéniteurs neuraux en phase S à E10.5 par une injection de BrdU et analysé la distribution de leurs descendants par des immuno-marquages anti-BrdU à E12.5. Dans le cas d'une injection aigue, le BrdU incorporé dans la cellule est dilué par deux à chaque phase S du cycle de division. L'intensité du marquage BrdU permet ainsi de déduire si le progéniteur a quitté son cycle cellulaire pour se différencier à E10.5 ou ultérieurement.

Une profonde altération de la distribution des cellules BrdU+ est observée chez les embryons  $Sema3B^{-/-}$  à E12.5 (**Figure 27**). Le nombre de cellules BrdU+ est réduit dans la partie dorsale du manteau des embryons  $Sema3B^{-/-}$  par rapport aux  $Sema3B^{+/+}$ . L'épaisseur du manteau est elle-même fortement réduite dorsalement. Nous pouvons en supposer que le timing de production des interneurons dorsaux est peut être affecté par la déficience de  $Sema3B$ .

A l'inverse au niveau de la corne ventrale de la moelle épinière, région où résident les motoneurons spinaux, nous observons une densité de cellules BrdU+ plus forte chez les embryons  $Sema3B^{-/-}$  que chez les  $Sema3B^{+/+}$ , ce qui traduit également une perturbation de la date de naissance des neurones de la corne ventrale. Une analyse de co-marquage anti-BrdU et anti-Islet1/2, un marqueur des motoneurons, est nécessaire pour compléter cette étude. Néanmoins, ces premiers résultats ouvrent la possibilité d'un déficit de naissance des motoneurons avant E10.5, suivi d'un "rebond" de naissance de motoneurons spinaux autour de E10.5 dans la condition  $Sema3B^{-/-}$ .

Ces premiers éléments d'analyse suggèrent donc que l'invalidation de  $Sema3B$  perturbe le timing de prolifération et différenciation de certaines populations de neurones spinaux entre E9.5 et E12.5. Des études approfondies de suivi du lignage cellulaire devront être effectués pour confirmer cette hypothèse. Les défauts de prolifération/neurogenèse observés chez les mutant  $Sema3B$  sont-ils une conséquence des défauts des angles de divisions mis en évidence au stade



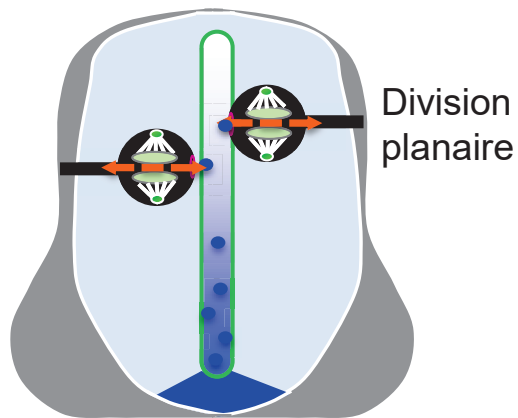


E10.5 ou traduisent-ils un autre rôle de Sema3B ? Nous aborderons cette question en discussion.



CHAPITRE III :  
CONCLUSIONS ET  
PERSPECTIVES

sauvage E10.5



Division  
planaire

Sema3B

Sécrétée par la plaque du  
plancher

**Figure 28 : Modèle d'action de Sema3B sur les progéniteurs.** Sema3B serait un signal extracellulaire provenant de la plaque du plancher et requis pour les divisions planaires en limitant les déviations des angles de division le long de l'axe apico-basal.

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai cherché à savoir si l'orientation des divisions cellulaires pouvait être contrôlée par des facteurs extrinsèques à la cellule. De nombreuses études ont porté sur les mécanismes intrinsèques à la cellule qui contrôle l'orientation du fuseau mitotique. La place de signaux extrinsèques contribuant à l'orientation des divisions cellulaires est restée allusive. A travers l'étude de la période de neurogenèse dans la moelle épinière de souris, j'ai montré que de tels signaux extracellulaires, étaient présents dans le canal du tube neural. Parmi ces signaux, j'ai identifié Sema3B, une Sémaphorine de classe III initialement connue pour son rôle chimiotropique sur certains axones et cellules en migration. Nos résultats montrent que Sema3B est exprimée par la plaque du plancher et qu'elle peut être sécrétée. Ils montrent aussi que Sema3B est nécessaire au maintien de divisions planaires. De plus, l'application de Sema3B exogène à des moelles épinières en configuration "livre ouvert" augmente la proportion de divisions planaires. Des résultats obtenus pendant cette thèse, je propose un modèle dans lequel Sema3B est sécrété par la plaque du plancher dans le canal central de la moelle épinière. Sema3B est perçue par une sous-population de progéniteurs neuraux, conférant une orientation planaire (parallèle à l'axe apico-basal) à leur division à E10.5 (**Figure 28**). Ce travail révèle donc un nouveau rôle d'une Sémaphorine et plus largement d'une molécule de guidage dans la division cellulaire. De plus, il montre qu'au-delà de son rôle organisateur, la plaque du plancher émet des signaux cruciaux dans le contrôle de l'orientation des divisions des progéniteurs.

Plusieurs questions restent cependant à élucider dans ce processus, notamment au niveau des mécanismes d'action de Sema3B sur les progéniteurs, des conséquences des altérations de l'orientation du fuseau mitotique sur le développement de la moelle épinière, du rôle de Sema3B dans d'autres contextes de prolifération et de l'implication d'autres facteurs de guidage dans l'orientation des divisions cellulaires.



## **1. Mécanismes d'action de la protéine Sema3B sur l'orientation des progéniteurs neuraux.**

Sema3B est donc apparue comme un facteur extracellulaire crucial au maintien de l'orientation planaire de divisions de progéniteurs neuraux de la moelle épinière à E10.5. Nous évoquerons dans cette partie plusieurs éléments permettant d'établir un modèle sur le mode d'action de Sema3B

### **a. Sema3B pourrait agir sur les progéniteurs aux stades en prophase/métaphase pour orienter leurs divisions**

L'orientation de la division est préfigurée par la position du fuseau mitotique à l'anaphase lors de la séparation des chromatides. Or la position du fuseau observée en anaphase est mise en place et fixée lors de la métaphase (Peyre et al., 2011; Roszko et al., 2006). La métaphase et peut-être aussi la prophase sont donc des étapes préparatoires cruciales à ce processus d'orientation. Les expériences de culture d'embryon en configuration "livre ouvert" ont montré que 3h d'incubation étaient suffisantes pour déréguler l'orientation de divisions de plus de 30% des progéniteurs neuraux. De même une exposition de 3h des moelles ouvertes à Sema3B suffit à restaurer un pourcentage significatif de divisions planaires. Etant donné que la mitose s'étale sur plus d'une heure, ces résultats indiquent que la voie par laquelle Sema3B agit sur ce processus est rapide. La fenêtre d'action de Sema3B se situe donc vraisemblablement lors de la prophase ou de la métaphase. De plus, nous avons montré que l'inactivation de Sema3B conduit à une augmentation des proportions des cellules en métaphase à E10.5. Ce résultat pourrait refléter à un allongement de la durée de métaphase relativement aux autres phases de la mitose ou à un arrêt de certaines cellules en métaphase, ce qui appuie l'hypothèse d'une action de Sema3B lors de la métaphase.

D'autres observations suggèrent que l'effet de Sema3B sur l'orientation des divisions des progéniteurs suit un mécanisme assez direct. En effet, les changements de pourcentages de divisions planaires et obliques chez les mutants KO Sema3B ne sont pas précédés d'une altération du nombre total de cellules en





mitose. Ceci indique qu'une sous-population des progéniteurs spinaux effectuant une division planaire chez les embryons sauvages, effectue une division oblique chez les embryons *Sema3B<sup>-/-</sup>*. D'autre part, les défauts d'orientation des mutants KO *Sema3B* ne sont pas une conséquence secondaire d'une perturbation de l'engagement des progéniteurs. Plusieurs travaux avaient mis en évidence que le taux de division oblique est plus élevé pour les progéniteurs engagés dans un cycle neurogénique par rapport aux progéniteurs "prolifératifs" (Chenn and McConnell, 1995; Gotz and Huttner, 2005; Kosodo et al., 2004). Or l'analyse de l'expression de *Tis21*, un marqueur des progéniteurs neurogéniques (Iacopetti et al., 1999), chez les KO *Sema3B*, indique que le contrôle du destin prolifératif versus neurogénique des progéniteurs n'est pas altéré par l'inactivation de *Sema3B* au stade E10.5. Ces résultats ont été confirmés lors d'une analyse transcriptomique comparative entre des zones ventriculaires d'embryons *Sema3B<sup>+/+</sup>* et *Sema3B<sup>-/-</sup>* faites en collaboration avec la plateforme ProfileXpert. Ces éléments plaident donc en faveur d'un mode d'action direct et à court terme de *Sema3B* sur l'orientation des divisions. Aussi les effets rapides de la perte ou du gain de *Sema3B* sur l'orientation de la mitose suggèrent que ce facteur est reçu directement par les progéniteurs en mitose.

#### **b. *Sema3B*, un signal polarisé dans l'axe apico-basal pour les progéniteurs en mitose**

Plusieurs questions sont ouvertes à ce stade de l'étude. Quel type d'information délivre *Sema3B* ? Quelles structures des progéniteurs reçoivent le signal *Sema3B* ? En quoi cette information contrôle-t-elle l'angle de division ?

Dans cette étude, j'ai pu montrer qu'au stade E10.5 la seule source de *Sema3B* est la plaque du plancher. Nous avons montré que *Sema3B* pouvait être sécrétée par cette plaque du plancher en culture. Par analogie avec d'autres facteurs sécrétés dans le canal central, il est raisonnable de penser que *Sema3B* diffuse dans ce canal. La partie apicale des progéniteurs, en contact avec la lumière du tube neural, serait donc en position de recevoir le facteur *Sema3B*. Ainsi la localisation de *Sema3B* dans le canal pourrait générer une signalisation polarisée dans l'axe apico-basal pour le progéniteur. Dans le contexte du guidage axonal, *Sema3B*, comme



d'autres Sema III, est un facteur chimiotropique. Sécrété par une source, il peut diffuser, formant ainsi un gradient autour de cette source. A l'approche de cette source, un cône de croissance compétent perçoit un différentiel de concentration, ce qui peut être suffisant pour polariser une réponse intracellulaire. La présence de Sema3B et son gradient fournissent donc une information spatiale à laquelle l'axone peut répondre par un changement d'orientation. Contrairement au cône de croissance, ou à une cellule en migration, le progéniteur en mitose est fixe. En revanche, le fuseau mitotique est mobile à l'intérieur de la cellule. Il est donc possible que la localisation de Sema3B au niveau apical fournisse une information spatiale interprétée par le progéniteur pour le positionnement de son fuseau par rapport à l'axe apico-basal. Un modèle d'action de la protéine que nous pouvons proposer est que Sema3B se fixe au niveau apical des progéniteurs leur donnant une information de position relativement à l'axe apico-basal. Le progéniteur oriente l'axe du fuseau mitotique parallèlement au plan apical grâce à ces informations spatiales de manière à favoriser une division planaire (**Figure 28**).

A ce stade de l'étude, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse que Sema3B constitue un signal « ON/OFF » dont la présence indique au progéniteur d'effectuer une division planaire. En effet, les cellules neuroépithéliales présente une polarité intrinsèque dans l'axe apico-basal. Cette polarité est reflétée par la présence de jonctions adhérentes au niveau apical, de facteurs comme aPKC et Par3 au pôle apical seulement. Cette polarité intrinsèque a un rôle crucial dans l'orientation des divisions. Une altération d'aPKC ou de Par3 conduit en effet à des défauts d'angles sévères (Hao et al., 2010). La polarité intrinsèque des cellules neuroépithéliales pourrait fournir les informations spatiales suffisantes pour l'orientation du fuseau mitotique par rapport à l'axe apico-basal. La cellule s'appuierait alors sur cette polarité apico-basale intrinsèque pour effectuer une division planaire en présence de Sema3B ou une division oblique en son absence. Cependant, un examen attentif des défauts d'orientation chez les mutants Sema3B<sup>-/-</sup> montre que les divisions obliques surnuméraires présentent des déviations de plus de 30° (classes 0-30° et 30-60°), qui sont rarement rencontrées lors des divisions obliques chez les embryons sauvages. La mécanique de positionnement du fuseau mitotique est donc elle-même affectée par l'absence de Sema3B à E10.5, ce qui soutient l'hypothèse d'un rôle direct de Sema3B sur le positionnement du fuseau.



### c. **Sema3B** contrôle l'orientation d'une sous-population de progéniteurs neuraux

Quels progéniteurs neuraux sont régulés par Sema3B ? Nous avons noté qu'une population des progéniteurs neuraux spinaux effectue une division planaire malgré l'absence de Sema3B. Ce résultat indique que seule une sous-population des cellules neuropithéliales répond à ce signal. Cette sous-population n'est pas restreinte aux domaines dorsaux ou ventraux de la moelle épinière (**Figure S4**). Quels sont les types de progéniteurs touchés par l'absence de Sema3B ? Sont-ils prolifératifs ? neurogéniques ? Pour répondre à cette question, la souris TIS21-GFP construite par Haubensak et collaborateurs, (Haubensak et al., 2004) pourrait être utilisée. Le gène Tis21 est exprimé lors de la phase G1 chez les progéniteurs neurogéniques (Iacopetti et al., 1999). Grâce à la persistance à long terme de la protéine GFP dans la cellule, il est donc possible de repérer les cellules neurogéniques entrant en mitose. Par vidéo-microscopie, nous pourrions donc suivre le comportement des cellules Tis21-GFP+ en l'absence de Sema3B et tester si le pourcentage de divisions obliques augmentent par rapport à la condition sauvage.

Il a été montré qu'au sein des divisions "morphologiquement" planaires, des divisions symétriques (dont les cellules filles ont le même destin) et des divisions asymétriques (dont les cellules filles ont des destins différents progéniteur+neurone par exemple) étaient observées. Nous pouvons nous demander si les cellules répondant à Sema3B correspondent à l'une de ces catégories. Pour cela, il est nécessaire de d'analyser en vidéo-microscopie l'angle de division d'un nombre suffisant de progéniteurs et de suivre le devenir symétrique ou asymétrique des cellules filles au cycle suivant. En comparant les situations Sema3B<sup>+/+</sup> et <sup>-/-</sup>, nous pourrions alors déterminer si une des sous-populations à divisions planaires est particulièrement affectée.

Nous avons montré que l'inactivation de Sema3B fait apparaître des déviations fortes de l'angle de division de certains progéniteurs par rapport à l'axe apico-basal. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les divisions présentant une



forte déviation chez les mutants  $Sema3B^{-/-}$  soient le résultat d'une dérégulation des divisions normalement obliques (de la classe 60-80°). Le rôle de Sema3B serait dans ce cas de limiter la déviation du plan de division. Pour préciser ce point, il est nécessaire d'identifier les cellules destinées à effectuer une division oblique. A notre connaissance, aucun marqueur prédictif spécifique de cette population n'a été mis en évidence à ce jour, ce qui limite cette étude.

#### **d. Sites de fixation de Sema3B, récepteurs et voie de signalisation impliqués**

Une question ouverte par ce travail porte sur la nature des sites de fixation de Sema3B aux progéniteurs. Une réception de protéines sécrétées dans le canal du tube neural par le pied apical des progéniteurs neuraux a été montrée dans le cas du morphogène Sonic Hedgehog. Il est lui-même sécrété par les cellules de la plaque du plancher et active une signalisation via les protéines transmembranaires Smoothened (Smo) ou Patched (Ptch), situées sur le cil primaire du pied apical des progéniteurs (Dessaud et al., 2008). Nous pourrions imaginer que Sema3B se lie à un récepteur au niveau ciliaire. Toutefois, l'absence de cil en fin de prophase et en métaphase rend peu probable cette hypothèse. Afin de préciser le site de fixation de Sema3B aux progéniteurs en mitose, des expériences de « binding » utilisant une fusion Sema3B-GFP sont en cours au laboratoire.

Quel(s) est(sont) le(s) récepteur(s) de Sema3B responsables de l'orientation des divisions cellulaires ? Les récepteurs de Sema3B mis en évidence dans le contexte du guidage cellulaire sont les Neuropilines 1 et 2 (He et al., 2002). Ces protéines transmembranaires sont des unités de liaison de Sema3B. Elles sont associées à d'autres protéines membranaires de la famille des Plexines et des IgCAM, lesquelles assurent la transduction du signal (Chen et al., 1998; Yazdani and Terman, 2006). L'expression de plusieurs Plexines a été montrée dans la zone ventriculaire au début de la neurogenèse chez le poulet (Mauti et al., 2006). L'analyse transcriptomique que nous avons effectuée au laboratoire sur la zone ventriculaire provenant de moelles épinières d'embryons de souris au stade E10.5 révèlent aussi l'expression de plusieurs Plexines (PlexA1,A2,B1,B2, données non





montrées). Ceci indique qu'elles pourraient être impliquées dans le complexe récepteur de Sema3B. Cependant, des hybridations in situ faites au laboratoire montrent que Nrp1 et Nrp2 ne sont pas exprimées dans les progéniteurs spinaux à E10.5 excluant ainsi l'hypothèse d'une conservation du mode de réception de Sema3B entre le guidage axonal et le contrôle de l'orientation des divisions.

La recherche de nouveaux récepteurs de Sema3B a donc été entreprise au laboratoire. Dans un premier temps, nous avons testé si certaines Plexines pouvaient être des sous-unités de liaison de Sema3B. Pour cela, des expériences de binding de Sema3B-GFP ont été effectuées sur des cellules HEK293 exprimant les différentes plexines de mammifères. A ce jour, malgré un travail d'optimisation des conditions expérimentales, nous n'avons pas détecté de liaison directe significative de Sema3B aux Plexines. Une liaison à faible affinité reste cependant envisageable pour certaines d'entre elles (Janssen et al., 2012). Il est possible que Sema3B se lie dans ce contexte à un récepteur non conventionnel n'appartenant pas aux familles Neuropilines ou Plexines. Pour identifier des récepteurs candidats, nous avons pensé qu'un rétrocontrôle pouvait exister entre Sema3B et l'expression de ce récepteur, l'inactivation de Sema3B pouvant se traduire par une augmentation ou diminution du taux de ce récepteur. Nous avons tiré parti des résultats de l'analyse transcriptomique des zones ventriculaires des moelles épinière entre les embryons contrôles et invalidés pour Sema3B au stade E10.5 et E11.5 et recherché les récepteurs dérégulés entre les deux conditions. Plusieurs récepteurs membranaires ont été identifiés: en particulier Neurotrimin, Cx3Cr1, LPAR1 (données non montrées). Ces récepteurs sont connus dans le contexte de la migration cellulaire. LPAR1 est particulièrement intéressant puisqu'il a été montré que son inactivation dans le cortex cérébral conduisait à l'altération de l'orientation des divisions de certains progéniteurs (Estivill-Torrus et al., 2008). Des expériences de "binding" sur cellules ont été effectuées pour tester la capacité de liaison de Sema3B sur ces candidats. Malheureusement, aucun n'a montré de liaison convaincante à ce jour. Il semble nécessaire pour poursuivre cette étude de mener un crible plus large. La lignée de souris KI Sema3B-GFP pourrait être utile. Elle permettrait d'immunoprécipiter Sema3B via le tag GFP et d'analyser ses partenaires par analyse protéomique en spectrométrie de masse. Toutefois, avant de lancer cette approche, notre attention a été attirée par un élément intéressant.



Les hybridations *in situ* faites au laboratoire révèlent une forte expression de Nrp1 et Nrp2 par les cellules de la plaque du plancher. Comme de nombreux récepteurs membranaires, les gènes de Neuropiline 1 et 2 codent différentes isoformes obtenues par excision/épissage alternatif ou par modification post-traductionnelles. Des isoformes solubles des Nrp1 et Nrp2 humaines ne portant que la partie extracellulaire ont été mises en évidence dans de nombreux tissus (Cackowski et al., 2004; Gagnon et al., 2000; Rossignol et al., 2000). L'analyse d'EST chez le poulet révèle aussi de multiples isoformes solubles que l'on peut détecter en RTPCR dans la moelle épinière (Sanyas et al., 2012a) et données non publiées). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la plaque du plancher sécrète des formes solubles de Nrp1 et Nrp2 dans le canal central, conjointement avec Sema3B. Des études biochimiques indiquent que le domaine extracellulaire des Neuropilines se lie aux Semalll et aux corécepteurs Plexin (Janssen et al., 2012). Nous pouvons donc envisager un mode d'action nouveau pour Sema3B. Sema3B et des isoformes solubles de Nrp1 et 2 sécrétées par la plaque du plancher formeraient un complexe fonctionnel avec des récepteurs plexines exprimés à la membrane des progéniteurs neuraux. Pour tester cette hypothèse, l'analyse des mutants Nrp1 et Nrp2 est en cours afin de rechercher une phénotypie du mutant KO Sema3B au niveau de l'orientation des angles de division.

Par quelle voie de signalisation Sema3B contrôle-t-il l'orientation du fuseau mitotique ? Nous avons présenté en introduction différentes voies contribuant à l'orientation du fuseau mitotique dans différents modèles. En particulier, la voie Gai-LGN-Numa est cruciale dans ce processus. Au niveau des progéniteurs neuraux des vertébrés, la petite protéine GTPase Gai liée au GDP forme un complexe avec LGN et Numa permettant l'ancrage et la mise sous tension des microtubules astraux. Localisé au niveau d'une ceinture corticale latérale, ce complexe permet de positionner le fuseau mitotique parallèlement au plan du neuroépithélium, favorisant les divisions planaires (Peyre et al., 2011). Les mécanismes responsables de la localisation de cette ceinture, en particulier de la forme Gai liée au GDP, sont mal compris. Nous pourrions proposer que Sema3B régule une voie de signalisation conduisant à l'échange GDP-GTP des Gai au niveau apical, ce qui restreindrait la forme Gai-GDP au niveau latéral ? Une étude fine de la localisation de LGN, Numa



par immunomarquage dans les progéniteurs mitotiques chez les mutants *Sema3B*<sup>-/-</sup> permettrait de tester cette hypothèse.

En introduction, nous avons évoqué le rôle du cytosquelette d'actine dans le positionnement du fuseau mitotique. Lors du guidage des cônes de croissance, les *SemaIII* peuvent provoquer localement l'assemblage ou le désassemblage des fibres d'actine en particulier via la voie de signalisation Rho/ROCK/LimKinase (confère III.2.c.). La LimKinase est activée en aval de RhoA et de ROCK, puis phosphoryle la cofiline ce qui favorise la polymérisation de l'actine (Chakrabarti et al., 2007; Kaji et al., 2008). Une perturbation de l'activité de RhoA et de la LimKinase entraîne des défauts d'orientation du fuseau mitotique (Kaji et al., 2008)(Roszko et al., 2006). Nous avons donc émis l'hypothèse que *Sema3B* pouvait, via la liaison au complexe *Nrp/Plex*, moduler la voie Rho/Rock/LimK/Cofiline et modifier l'actine corticale au niveau apicale ou latérale. Ceci délimiterait ainsi des domaines d'ancrage latéraux pour les fibres astrales et favoriserait ainsi l'orientation planaire du fuseau mitotique. Des expériences sont nécessaires pour analyser l'implication des voies Rho-GTPase et LimKinase dans notre modèle : Western-blot ou test Elisa afin de détecter l'état de phosphorylation de la LimK et de la Cofiline, Immunomarquages phospho-LimK, Cofiline et P-Cofiline, en présence ou absence de *Sema3B*, analyse de l'orientation du fuseau mitotique des embryons dont le tube neural a été ouvert avec diverses combinaisons de *Sema3B*-Fc et d'inhibiteur des voies Rho-GTPase. Il serait intéressant de regarder en détail l'état de l'actine corticale chez nos mutants pour *Sema3B* et plus particulièrement au niveau des cellules dont l'orientation du fuseau mitotique est altérée.

Une autre voie intéressante à explorer est celle de la régulation des microtubules par la voie des CRMP. CRMP2 (pour Collapse Response Mediator, Protein 2) est une phosphoprotéine cytosolique, qui promeut la polymérisation des microtubules (Confère partie III.2.c.i.) (Fukata et al., 2002). Il a été montré que l'activité de CRMP2 était modulée par des *SemaIII* via le complexe récepteur *Nrp/plexin* et des kinases comme *Fyn* et *Fes* (Fiore and Puschel, 2003; Fukata et al., 2002; Mitsui et al., 2002; Sasaki et al., 2002). Nous pouvons imaginer que *Sema3B* régule la stabilité ou la dynamique des microtubules du fuseau mitotique via CRMP2,



par exemple en inhibant la croissance de fibres astrales à proximité du pôle apical, ce qui empêcherait une orientation oblique et favoriserait les divisions planaires.

Enfin, une dernière voie envisageable concerne la voie de régulation de la polarité apico-basale des progéniteurs neuraux, polarité qui est cruciale pour l'orientation des divisions. *Sema3B* pourrait moduler la localisation ou l'activité des protéines cruciales dans cette polarité. Durant ma thèse, j'ai analysé la distribution spatiale de molécules de polarité comme ZO1 et aPKC, aucun défaut évident n'a été observé chez les mutants *Sema3B*. Des analyses complémentaires sont requises pour exclure définitivement un rôle de *Sema3B* sur la polarité apico-basale des progéniteurs en lien avec l'orientation des divisions.

## **2. Rôle de *Sema3B* dans l'orientation des divisions par rapport aux dorso-ventral et antéro-postérieur**

L'expression de la protéine *Sema3B* au stade E10.5 par les cellules de la plaque du plancher suggère une possible distribution en gradient de cette Sémaphorine le long de l'axe dorso-ventral dans le canal, par analogie au morphogène Shh et un effet de polarisation sur le comportement des progéniteurs neuraux par rapport à cet axe. Nous nous sommes demandés si l'inactivation de *Sema3B* pouvait altérer l'orientation des divisions par rapport à l'axe dorso-ventral (D/V).

A notre grande surprise, les résultats obtenus révèlent d'abord dans la condition sauvage, une absence d'orientation préférentielle de l'axe de division par rapport aux axes antéro-postérieur (A/P) et D/V. Ceci traduisant un caractère aléatoire du positionnement de cet axe dans les composantes A/P et D/V, contrairement à leur composante apico-basale. Les mêmes conclusions sont tirées si nous analysons les angles de division dans des domaines restreints de la moelle épinière (dorsaux, intermédiaires ou ventraux). Il existe un équilibre global et local entre les classes d'orientation. Nous pouvons nous demander si cette situation tient à une absence de déterminisme des angles selon ces axes et à un choix aléatoire des positions du fuseau dans ce cas, ou au contraire à l'existence de mécanismes





actifs garantissant cet équilibre entre classes d'angles. En effet, si le positionnement d'un fuseau mitotique a lieu de manière aléatoire et indépendamment de l'orientation des fuseaux des cellules voisines, des distorsions pourraient apparaître localement et la croissance du tube neural dans les différents axes pourrait être mal coordonnée. Une voie de communication intercellulaire permettant de diversifier localement les orientations des divisions pourrait éviter ce type de problème.

Une telle hypothèse est plausible si l'on se réfère au principe d'inhibition latérale contrôlée de la voie Delta-Notch au cours de la neurogenèse. Il a été montré que la génération des lignages de neurones du cortex peut être en grande partie récapitulée *in vitro* à partir de cellules ES, donc en absence d'un contexte de communication cellulaire complexe (Gaspard et al., 2009). Les progéniteurs neuraux semblent pouvoir mettre en œuvre un programme de neurogenèse de manière relativement autonome. Pourtant *in vivo*, le mécanisme d'inhibition latérale entre progéniteurs neuraux contrôlée par la signalisation Delta-Notch est nécessaire à la neurogenèse. Il a été montré que des perturbations de cette voie peuvent conduire à une altération du nombre final de neurones et du timing de leur génération. Dans le contexte d'un tissu organisé et complexe comme le neuroépithélium, des mécanismes comme la voie Delta-Notch semblent donc essentielles pour répartir de manière homogène la naissance des neurones dans l'espace du neuroépithélium et dans le temps, de manière à éviter l'agrégation de neurones au même site. Les mécanismes d'inhibition latérale permettent d'éviter ces clusters locaux de neurones. Il est possible que cette problématique de répartition de la naissance des neurones dans un tissu complexe s'étende aussi à l'orientation des divisions dans le plan. Les divisions neurogéniques pourraient s'effectuer selon une orientation spécifique pour éviter la formation intempestive de clusters de neurones. Les cellules étant jointes les unes aux autres, la cohésion des cellules ou la limitation des distorsions nécessitent peut-être aussi une coordination des angles de divisions par des mécanismes actifs. Ceci tout en respectant un équilibre final entre les différentes classes pour assurer une croissance harmonieuse du tissu, pouvant alors donner l'impression d'une randomisation.

L'analyse de l'orientation des divisions par rapport aux axes A/P et D/V montre que l'équilibre entre les différents classes d'angles présents chez le sauvage est



perdu chez les mutants KO Sema3B à E10.5 au niveau ventral de la moelle épinière. Une augmentation de 15% du pourcentage des divisions dont le plan est parallèle ou sub-parallèle à l'axe D/V est observée, au détriment d'autres classes d'angles, chez les mutants Sema3B<sup>-/-</sup>. Ces résultats indiquent donc que Sema3B influe sur l'orientation des divisions par rapport aux axes D/V et A/P pour une sous-population de progéniteurs spinaux.

Un lien existe-t-il entre les défauts d'orientation observés dans la composante apico-basale et dans la composante D/V-A/P? Nous remarquons une altération des deux composantes à E10.5 et pas à E11.5, suggérant un lien entre les 2 types de défauts. Si à E10.5, la composante apico-basale des angles est affectée aussi bien ventralement que dorsalement, en revanche la composante D/V-A/P n'est significativement altérée que ventralement chez les mutants Sema3B<sup>-/-</sup>. Un couplage est donc possible entre ces composantes mais pas systématique. Néanmoins, cette situation mérite plus d'attention. En effet, dans le contexte de la division des neuroblastes et des précurseurs d'organes sensoriels (SOP) chez la drosophile, des travaux très intéressants montrent que les divisions asymétriques sont obliques par rapport à l'axe apico-basal et orthogonales par rapport à l'axe A/P. Ce qui dispose les deux cellules filles de destin différent dans la même position relative par rapport à cet axe. Ce contrôle coordonné de l'orientation des divisions dans les deux composantes est couplé à l'existence de déterminants cytoplasmiques du destin eux-mêmes polarisés dans l'axe antéro-postérieur par des signaux de polarité planaires (Segalen and Bellaïche, 2009). Dans ce contexte, une coordination entre cette polarité et l'orientation des divisions est cruciale à l'héritage asymétrique approprié de ces déterminants. L'existence de déterminants cytoplasmiques dans les progéniteurs neuraux de vertébrés n'est pas démontrée à ce jour. Pourtant, une coordination des différentes composantes de l'orientation des divisions asymétriques est envisageable. A ce titre, la perturbation de certaines divisions planaires en obliques chez le mutant Sema3B pourrait conduire des cellules à orienter leur fuseau parallèlement à l'axe dorso-ventral de manière forcée, ce qui expliquerait nos observations. Il est nécessaire d'examiner les 3 composantes de l'orientation des divisions chez les embryons sauvages et KO Sema3B pour répondre à cette question. Ces résultats ouvrent donc les portes d'un champ d'investigation très



intéressant sur le rôle des SemaIII dans le contrôle des différentes composantes d'orientation des divisions cellulaires.

### **3. Implication de Sema3B dans la balance prolifération/neurogenèse et lien avec le contrôle de l'orientation des divisions**

Les résultats obtenus au cours de cette thèse montrent, chez les embryons Sema3B<sup>-/-</sup>, des défauts durant les étapes précoces de la neurogenèse et aux stades suivants E11.5 et E12.5. Au stade E11.5, l'inactivation de Sema3B conduit à une diminution du nombre de cellules en mitose. Au stade E12.5, nous pouvons observer une diminution de la taille et une altération de la forme de la moelle épinière chez les mutants KO Sema3B. De plus, une profonde modification de la distribution des cellules marquées au BrdU au stade E10.5 est aussi observée au stade E12.5 chez ces mutants. Ces phénotypes sont-ils liés entre eux ? Sont-ils des conséquences directes des altérations d'angles de divisions observées à E10.5 ? Ou sont-ils dus à d'autres rôles de Sema3B pendant la période de neurogenèse ?

En effectuant une incorporation de BrdU à E10.5, c'est-à-dire lors de la période où des défauts de division ont lieu, nous avons suivi le devenir des cellules filles issues de mitose. Au stade E12.5 une réduction du nombre de cellules BrdU<sup>+</sup> dans la région dorsale du manteau chez les mutants Sema3B<sup>-/-</sup> est observé, traduisant un déficit de production d'interneurones dorsaux entre E10.5 et E12.5. De plus, chez les embryons Sema3B<sup>+/+</sup>, nous observons qu'une large proportion de neurones ventraux sont BrdU<sup>-</sup>, donc nés entre E9.5 et E10.5 avant l'injection de BrdU. Cette proportion de cellules BrdU<sup>-</sup> est réduite chez les mutants Sema3B<sup>-/-</sup>. Nous pouvons constater l'inverse une augmentation nette de la proportion de cellules BrdU<sup>+</sup> dans la corne ventrale chez les mutants KO Sema3B. Ces résultats indiquent un déficit de production de neurones ventraux, probablement des motoneurones, avant E10.5, puis une surproduction de neurones ventraux entre E10.5 et E11.5. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'augmentation du pourcentage de divisions obliques perturbe le timing de neurogenèse, les divisions obliques surnuméraires convertissant des divisions symétriques en divisions asymétriques. Une étude plus complète de timing de neurogenèse est en cours. Pour cela, nous

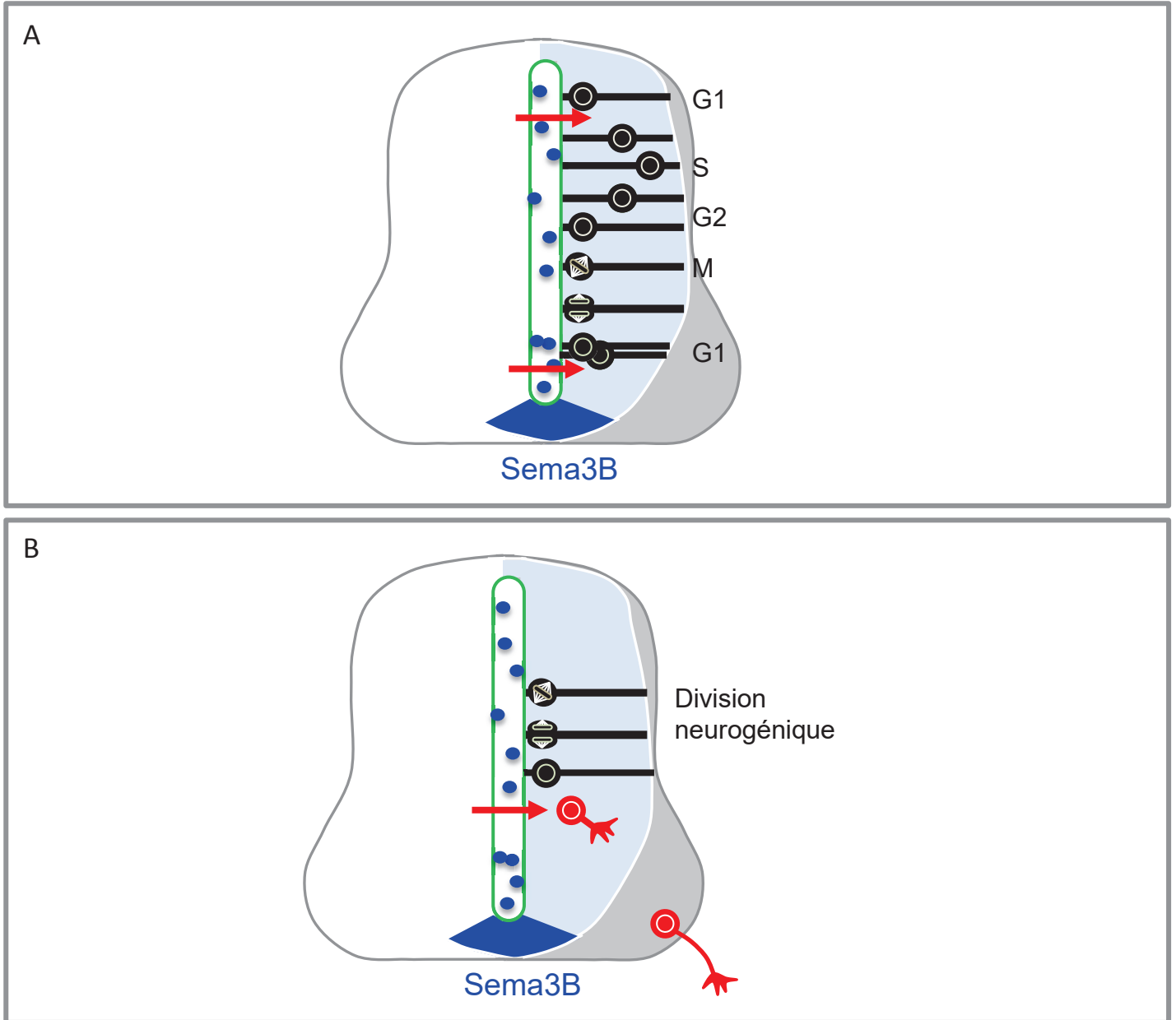


effectuons une injection d'EdU au stade E9.5 et une de BrdU à E10.5. Puis nous révélerons ces marqueurs et marqueurs d'identité neuronale comme *Islet1/2* au stade E12.5. Des expériences de suivi de l'orientation des progéniteurs en mitose et de leur devenir en time-lapse seraient aussi très informatives.

La question de l'impact de l'orientation des divisions cellulaires sur le destin des cellules filles dans la neurogenèse est une question récurrente qui est l'objet d'une longue controverse. En effet, l'altération de l'orientation des divisions dans la moelle épinière ou le cortex des vertébrés par la perte ou le gain de fonction de protéines comme LGN ne conduit pas à des perturbations du lignage ou du destin (Morin et al., 2007). En revanche, des défauts sévères de timing de neurogenèse et de destin neuronal ont été observés lors de la perturbation de  $G\beta\gamma$ , d'AGS3, *mInsc*, *Lis1* et *ASPM* (Buchman et al., 2011; Fish et al., 2006; Postiglione et al., 2011; Sanada and Tsai, 2005; Yingling et al., 2008) conjointement à des défauts d'orientation. Les résultats issus de mes travaux concordent avec ces observations. Comment expliquer ces résultats contradictoires? Les mécanismes déterminant le destin symétrique ou asymétrique de cellules filles d'un progéniteur neural sont mal compris. Par analogie avec les données obtenues chez les invertébrés, un modèle possible propose que ce destin dépende de déterminants cytoplasmiques (pro-neuronal ou pro-prolifératif) et de leur l'héritage symétrique ou asymétrique lors de la mitose. Dans ce schéma, un changement d'orientation de la division peut perturber la répartition de ces déterminants dans les cellules filles, ce qui peut modifier leur destin.

Il est possible que les expériences de perte de fonction de LGN touchent des populations de progéniteurs n'exprimant pas de déterminant de destin. Dans ce cas, quelle que soit l'orientation de division, le destin des cellules filles reste symétrique. Seule leur organisation au sein du neuroépithélium est altérée (Morin et al., 2007). Il est aussi possible que les déterminants de destin cellulaire soient couplés à des structures comme les centrosomes ou le fuseau. Dans ce cas, si l'invalidation de LGN ne rompt pas ce couplage, une perturbation de l'angle n'a pas d'effet sur l'héritage des déterminants par les cellules filles. Ce modèle est soutenu par des études récentes sur l'héritage des centrosomes. Lors de la phase S, le centrosome de la cellule subit une duplication selon un mode semi-conservatif. Il en naît deux





**Figure 29 : Rôle répulsif de Sema3B au niveau des progéniteurs. A.** Sema3B agirait sur les progéniteurs en division permettant la répulsion de leur noyau en phase G1 vers le pôle basal. **B.** Sema3B permettrait la répulsion des cellules filles post mitotiques, provenant de divisions neurogéniques, vers la zone du manteau.

centrosomes dont l'âge des composants varie: un centrosome "père" et un centrosome "fils". Lors de la corticogenèse, un suivi des centrosomes père et fils pendant la mitose des progéniteurs de la ZV montrent que le centrosome fils est hérité par la cellule qui va s'engager dans la différenciation neuronale et que le centrosome père est hérité par la cellule fille qui garde le caractère progéniteur (Wang et al., 2009). De plus, une perturbation de la composition des centrioles conduit à une déplétion du pool de progéniteurs. Ces travaux suggèrent donc que les centrosomes peuvent être couplés différemment à des déterminants de destin en fonction de leur âge (Wang et al., 2009). Chez les mutants LGN, ce couplage ne serait pas rompu, et malgré les défauts de positionnement du fuseau, l'héritage des déterminants entre les deux cellules filles serait respecté, ce qui expliquerait l'absence de défauts de neurogenèse.

L'observation d'un défaut de neurogenèse associé à des défauts d'orientation suggère deux hypothèses. Prenant le cas de *Sema3B*, l'inactivation de *Sema3B* pourrait affecter le couplage des déterminants de destin avec le centrosome en plus de l'orientation du fuseau mitotique. Dans ce cas, l'héritage de ces déterminants entre les deux cellules filles ne serait plus respecté, ce qui peut expliquer une altération de la neurogenèse. Une autre hypothèse est que *Sema3B* intervienne dans d'autres étapes du cycle cellulaire cruciales dans la spécification du destin des progéniteurs neuraux. Dans la zone ventriculaire (ZV), les noyaux des progéniteurs neuraux effectuent des mouvements interkinétiques, c'est-à-dire des oscillations le long de l'axe apico-basal synchronisées avec les phases du cycle cellulaire. Par ailleurs, à l'issue d'une division neurogénique, le précurseur neuronal migre en direction du manteau, libérant son ancrage apical. Ces mouvements sont portés par la dynamique du cytosquelette. Compte-tenu des effets que les Sémaphorines ont sur la migration cellulaire, il est possible que l'absence de *Sema3B* dans le canal central ait un impact sur le mouvement interkinétique ou la sortie de la ZV des cellules post-mitotiques (**Figure 29A et B**). En ce qui concerne le mouvement interkinétique, une étude menée sur la rétino-genèse du poisson zèbre, qui a consisté à modifier la vitesse de ce mouvement, a révélé des défauts de neurogenèse, suggérant un couplage entre mouvement interkinétique et spécification du destin neuronal. Les auteurs ont proposé que la vitesse du mouvement interkinétique puisse avoir une influence sur le temps d'exposition des progéniteurs à des facteurs



pro-neuronaux ou pro-prolifératifs comme la signalisation Delta-Notch (Del Bene et al., 2008). Nous pouvons nous demander si Sema3B influe sur la vitesse ou l'amplitude du mouvement interkinétique et de manière concomitante sur le déroulement du cycle cellulaire. La réduction du nombre de cellules en mitose à E11.5 et l'altération du timing de neurogenèse observé lors des expériences de marquage au BrdU chez les embryons Sema3B<sup>-/-</sup> pourraient être une conséquence indirecte d'un ralentissement du mouvement interkinétique et d'un rallongement du cycle cellulaire. Un suivi en vidéo-microscopie de la vitesse de ces mouvements devrait permettre de savoir si Sema3B a un rôle sur le mouvement interkinétique nucléaire. Nous avons prévu d'utiliser la lignée de souris Fucci à cet effet. Toutefois la fluorescence rouge marquant la phase G1 s'est révélée trop faible pour poursuivre cette approche.

Au stade E11.5, nous avons observé une accumulation de cellules en phase G0 dans la ZV ventrale et une augmentation de la densité du marqueur de neurones en début de différenciation TuJ1, chez les mutants Sema3B<sup>-/-</sup>. Ces résultats peuvent traduire une surproduction de neurones ventralement, ce qui est en accord avec les expériences de datation au BrdU. Ils peuvent aussi traduire un retard de sortie de la zone ventriculaire des jeunes neurones post-mitotiques en absence de Sema3B. Sema3B pourrait alors avoir un rôle "répulsif" sur les précurseurs neuronaux facilitant leur expulsion de la zone ventriculaire. Une analyse en time lapse pourrait répondre à cette question.

Cette étude soulève donc de nombreuses questions sur les rôles de Sema3B pendant la neurogenèse. Le patron d'expression de Sema3B change pendant cette période. D'abord restreinte à la plaque du plancher à E9.5 et E10.5, l'expression est ensuite activée dans les progéniteurs neuronaux ventraux à E11.5. Cette évolution rend complexe l'interprétation du rôle de Sema3B, chaque domaine d'expression pouvant avoir des effets différents sur la neurogenèse. Pour mieux disséquer cette question, il serait informatif de coupler les analyses précédentes à l'inactivation conditionnelle de Sema3B (grâce à la lignée KI Sema3B floxée) dans la plaque du plancher par croisement à une lignée Shh::Cre ou dans les progéniteurs neuronaux grâce à une lignée Nestine::Cre. Ces travaux sont envisagés au laboratoire.

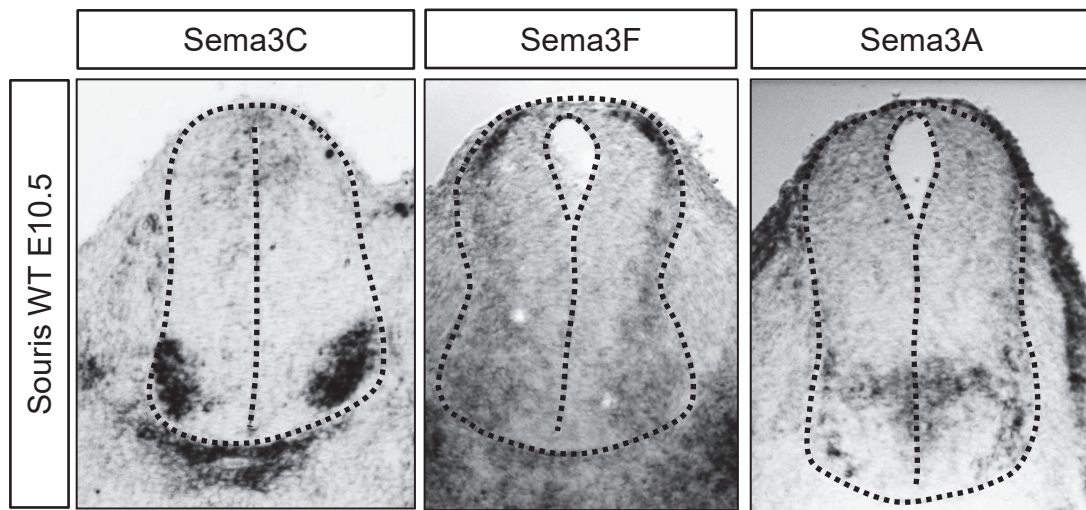


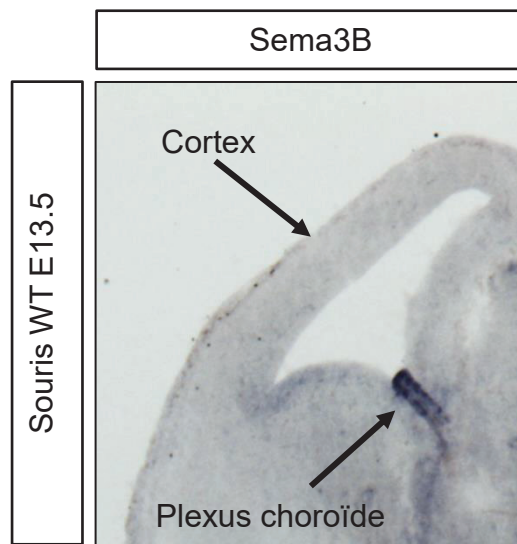
Figure 30 : Expression de différents membres des Semaphorine (Sema3C, Sema3F, Sema3A) dans la moelle épinière de souris au stade E10.5 par Hybridation *in situ*.

#### 4. Conservation des rôles entre les différentes Sémaphorines, molécules de guidage et organes

Nous avons mis en évidence un signal extracellulaire, Sema3B, sécrété par les cellules de la plaque du plancher dans le canal épendymaire et reçu par les progéniteurs neuraux maintenant leur division dans une orientation planaire. Ce rôle de signal extracellulaire régulant l'orientation des divisions est-il partagé par différentes Sémaphorines ?

Nous avons remarqué que l'exposition à Sema3B-Fc des moelles épinières ouvertes ne restaure pas intégralement le phénotype d'orientation des divisions. Ce résultat pourrait être dû à des limitations expérimentales. Alternativement, d'autres facteurs pourraient être impliqués dans ce processus. Nous nous sommes intéressés à l'expression d'autres Sémaphorines au stade E10.5 (**Figure 30**). Certains membres sont exprimés dans les progéniteurs neuraux ou dans la plaque du toit comme Sema3A, Sema3C, Sema5B ou Sema6A à E10.5 et au-delà. Il serait donc intéressant d'analyser l'orientation des angles de divisions chez des mutants invalidés pour ces Sémaphorines. Nous disposons au laboratoire de la souris Sema3C et Sema5B-GFP floxée. En croisant cette dernière lignée avec une souris exprimant la recombinaison CRE sous le contrôle du promoteur de Nestine, (s'exprimant dans la zone ventriculaire à partir du stade E10) nous pourrions analyser au stade E10.5 le comportement des progéniteurs pendant leurs divisions et tester si ce comportement phénocopie le phénotype des mutants Sema3B. Concernant Sema3C, Isabelle Sanyas avait entamé une analyse de l'index mitotique, à E11.5. Cette étude n'a pas montré de défauts de ce paramètre. Il serait intéressant d'approfondir ses analyses, chaque Sémaphorine pouvant affecter des populations spécifiques de progéniteurs et des stades différents.

Nous pouvons nous demander si d'autres facteurs de guidage contribuent à l'orientation des divisions des progéniteurs neuraux. Il a été montré récemment que la signalisation Robo/Slit participe à la prolifération des progéniteurs neuraux du cortex (Borrell et al., 2012). Des Ephrines B ont aussi été impliquées dans le contrôle de la prolifération lors de la corticogénèse (Qiu et al., 2008). Nous pouvons émettre



**Figure 31 : Expression de Sema3B dans le cortex de souris au stade E13.5 par Hybridation *in situ*. Sema3B est exprimée dans les plexus choroïdes du cortex**

l'hypothèse d'un rôle partagé de certaines voies de signalisation entre guidage axonal et orientation des divisions des progéniteurs neuraux.

Lors de ma thèse je me suis intéressée à la moelle épinière. Le cortex cérébral est un modèle de neurogenèse très étudié chez la souris et aussi plus complexe, possédant plusieurs centres organisateurs, une diversité de progéniteurs et des type neuronaux plus variés que la moelle épinière. De nombreux outils sont disponibles afin de manipuler les embryons (comme les électroporations). Suite aux résultats obtenus et à l'expression de Sema3B dans les plexus choroïdes (**Figure 31**), nous élargissons notre analyse aux orientations des divisions dans le cortex et au rôle de Sema3B dans ce contexte. Le rôle de Sema3B est-il conservé chez les autres vertébrés et invertébrés? Sema3B n'est pas exprimée dans les cellules de la plaque du plancher chez le poulet. Le modèle poulet ne peut donc malheureusement pas constituer un modèle complémentaire à notre étude de Sema3B. En revanche, Sema3C et Sema5B sont exprimés par la plaque du plancher. Nous pourrions donc étudier chez le poulet l'implication de ces Sémaphorines de rôle dans l'orientation des divisions des progéniteurs neuraux.

En conclusion, mon travail de thèse a permis de mettre en évidence l'existence de signaux extracellulaires régulant l'orientation des angles de division des progéniteurs neuraux de la moelle épinière. Le signal candidat identifié, Sema3B, est sécrété par les cellules de la plaque du plancher et agirait au niveau de pieds des progéniteurs neuraux, les maintenant leur division dans une orientation planaire. Ce travail suggère également la possibilité d'autres rôles de Sema3B dans les étapes précoces de la neurogenèse et la participation d'autres signaux extracellulaires dans ce processus. Il ouvre des perspectives intéressantes dans des situations pathologiques comme le cancer. En effet, de nombreuses formes de tumeurs expriment des Sémaphorines et leurs récepteurs. L'étude de l'impact des Sémaphorines sur l'orientation des divisions des cellules tumorales pourrait s'avérer informative sur les mécanismes de tumorigenèse. Enfin une forte expression de Sema3B est détectée dans les plexus choroïdes chez l'adulte (Allen Brain Atlas). Ces plexus libèrent dans liquide cérébro-spinal de multiples facteurs essentiels pour l'homéostasie cérébrale (Zappaterra and Lehtinen, 2012). Ces résultats ouvrent donc





un champ d'investigation du rôle de Sema3B dans la neurogenèse adulte et de ses éventuelles implications dans des pathologies comme la dépression.



# BIBLIOGRAPHIE



Adams, R.H., Lohrum, M., Klostermann, A., Betz, H., and Puschel, A.W. (1997). The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. *The EMBO journal* *16*, 6077-6086.

Afshar, K., Willard, F.S., Colombo, K., Johnston, C.A., McCudden, C.R., Siderovski, D.P., and Gonczy, P. (2004). RIC-8 is required for GPR-1/2-dependent Galpha function during asymmetric division of *C. elegans* embryos. *Cell* *119*, 219-230.

Aizawa, H., Wakatsuki, S., Ishii, A., Moriyama, K., Sasaki, Y., Ohashi, K., Sekine-Aizawa, Y., Sehara-Fujisawa, A., Mizuno, K., Goshima, Y., *et al.* (2001). Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nature neuroscience* *4*, 367-373.

Alexandre, P., Reugels, A.M., Barker, D., Blanc, E., and Clarke, J.D. (2010). Neurons derive from the more apical daughter in asymmetric divisions in the zebrafish neural tube. *Nature neuroscience* *13*, 673-679.

Alkuraya, F.S., Cai, X., Emery, C., Mochida, G.H., Al-Dosari, M.S., Felie, J.M., Hill, R.S., Barry, B.J., Partlow, J.N., Gascon, G.G., *et al.* (2011). Human mutations in NDE1 cause extreme microcephaly with lissencephaly [corrected]. *American journal of human genetics* *88*, 536-547.

Alvarez, I.S., and Schoenwolf, G.C. (1992). Expansion of surface epithelium provides the major extrinsic force for bending of the neural plate. *The Journal of experimental zoology* *261*, 340-348.

Anliker, B., and Chun, J. (2004). Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *The Journal of biological chemistry* *279*, 20555-20558.

Artavanis-Tsakonas, S., Delidakis, C., Fehon, R., Hartley, D., Herndon, V., Johansen, K., Markopoulou, K., Preiss, A., Rebay, I., Scottgale, N., *et al.* (1990). Notch and the molecular genetics of neuroblast segregation in *Drosophila*. *Molecular reproduction and development* *27*, 23-27.

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* *284*, 770-776.

Arvan, P., and Castle, D. (1998). Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *The Biochemical journal* *332* ( Pt 3), 593-610.

Asami, M., Pilz, G.A., Ninkovic, J., Godinho, L., Schroeder, T., Huttner, W.B., and Gotz, M. (2011). The role of Pax6 in regulating the orientation and mode of cell division of progenitors in the mouse cerebral cortex. *Development* *138*, 5067-5078.

Azimzadeh, J., and Marshall, W.F. (2010). Building the centriole. *Current biology : CB* *20*, R816-825.

Baena-Lopez, L.A., Baonza, A., and Garcia-Bellido, A. (2005). The orientation of cell divisions determines the shape of *Drosophila* organs. *Current biology : CB* *15*, 1640-1644.

Barros, C.S., Phelps, C.B., and Brand, A.H. (2003). *Drosophila* nonmuscle myosin II promotes the asymmetric segregation of cell fate determinants by cortical exclusion rather than active transport. *Developmental cell* *5*, 829-840.

Becker, P.M., Tran, T.S., Delannoy, M.J., He, C., Shannon, J.M., and McGrath-Morrow, S. (2011). Semaphorin 3A contributes to distal pulmonary epithelial cell differentiation and lung morphogenesis. *PloS one* *6*, e27449.

Bellaiche, Y., Beaudoin-Massiani, O., Stuttem, I., and Schweisguth, F. (2004). The planar cell polarity protein Strabismus promotes Pins anterior localization during asymmetric division of sensory organ precursor cells in *Drosophila*. *Development* *131*, 469-478.



Bellaiche, Y., and Gotta, M. (2005). Heterotrimeric G proteins and regulation of size asymmetry during cell division. *Current opinion in cell biology* 17, 658-663.

Bellanger, J.M., and Gonczy, P. (2003). TAC-1 and ZYG-9 form a complex that promotes microtubule assembly in *C. elegans* embryos. *Current biology : CB* 13, 1488-1498.

Bellon, A., Luchino, J., Haigh, K., Rougon, G., Haigh, J., Chauvet, S., and Mann, F. (2010). VEGFR2 (KDR/Flk1) signaling mediates axon growth in response to semaphorin 3E in the developing brain. *Neuron* 66, 205-219.

Bement, W.M., Benink, H.A., and von Dassow, G. (2005). A microtubule-dependent zone of active RhoA during cleavage plane specification. *The Journal of cell biology* 170, 91-101.

Bement, W.M., Miller, A.L., and von Dassow, G. (2006). Rho GTPase activity zones and transient contractile arrays. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 28, 983-993.

Berndt, J.D., and Halloran, M.C. (2006). Semaphorin 3d promotes cell proliferation and neural crest cell development downstream of TCF in the zebrafish hindbrain. *Development* 133, 3983-3992.

Bertrand, N., Castro, D.S., and Guillemot, F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nature reviews Neuroscience* 3, 517-530.

Berzat, A., and Hall, A. (2010). Cellular responses to extracellular guidance cues. *The EMBO journal* 29, 2734-2745.

Bielenberg, D.R., and Klagsbrun, M. (2007). Targeting endothelial and tumor cells with semaphorins. *Cancer metastasis reviews* 26, 421-431.

Bilder, D., and Perrimon, N. (2000). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* 403, 676-680.

Borrell, V., Cardenas, A., Ciceri, G., Galceran, J., Flames, N., Pla, R., Nobrega-Pereira, S., Garcia-Frigola, C., Peregrin, S., Zhao, Z., *et al.* (2012). Slit/Robo signaling modulates the proliferation of central nervous system progenitors. *Neuron* 76, 338-352.

Bowman, S.K., Neumuller, R.A., Novatchkova, M., Du, Q., and Knoblich, J.A. (2006). The *Drosophila* NuMA Homolog Mud regulates spindle orientation in asymmetric cell division. *Developmental cell* 10, 731-742.

Briscoe, J., and Ericson, J. (2001). Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Current opinion in neurobiology* 11, 43-49.

Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T.M., and Ericson, J. (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101, 435-445.

Buchman, J.J., Durak, O., and Tsai, L.H. (2011). ASPM regulates Wnt signaling pathway activity in the developing brain. *Genes & development* 25, 1909-1914.

Buck, K.B., and Zheng, J.Q. (2002). Growth cone turning induced by direct local modification of microtubule dynamics. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 9358-9367.

Bultje, R.S., Castaneda-Castellanos, D.R., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Kriegstein, A.R., and Shi, S.H. (2009). Mammalian Par3 regulates progenitor cell asymmetric division via notch signaling in the developing neocortex. *Neuron* 63, 189-202.

Cabernard, C., and Doe, C.Q. (2009). Apical/basal spindle orientation is required for neuroblast homeostasis and neuronal differentiation in *Drosophila*. *Developmental cell* 17, 134-141.

Cackowski, F.C., Xu, L., Hu, B., and Cheng, S.Y. (2004). Identification of two novel alternatively spliced Neuropilin-1 isoforms. *Genomics* 84, 82-94.





Cai, Y., Yu, F., Lin, S., Chia, W., and Yang, X. (2003). Apical complex genes control mitotic spindle geometry and relative size of daughter cells in *Drosophila* neuroblast and pl asymmetric divisions. *Cell* 112, 51-62.

Campbell, D.S., and Holt, C.E. (2003). Apoptotic pathway and MAPKs differentially regulate chemotropic responses of retinal growth cones. *Neuron* 37, 939-952.

Canman, J.C., Hoffman, D.B., and Salmon, E.D. (2000). The role of pre- and post-anaphase microtubules in the cytokinesis phase of the cell cycle. *Current biology* : CB 10, 611-614.

Casazza, A., Fazzari, P., and Tamagnone, L. (2007). Semaphorin signals in cell adhesion and cell migration: functional role and molecular mechanisms. *Advances in experimental medicine and biology* 600, 90-108.

Castanon, I., and Gonzalez-Gaitan, M. (2011). Oriented cell division in vertebrate embryogenesis. *Current opinion in cell biology* 23, 697-704.

Castellani, V. (2002). The function of neuropilin/L1 complex. *Advances in experimental medicine and biology* 515, 91-102.

Causeret, F., Ensini, M., Teissier, A., Kessar, N., Richardson, W.D., Lucas de Couville, T., and Pierani, A. (2011). Dbx1-expressing cells are necessary for the survival of the mammalian anterior neural and craniofacial structures. *PloS one* 6, e19367.

Chakrabarti, R., Jones, J.L., Oelschlager, D.K., Tapia, T., Tousson, A., and Grizzle, W.E. (2007). Phosphorylated LIM kinases colocalize with gamma-tubulin in centrosomes during early stages of mitosis. *Cell Cycle* 6, 2944-2952.

Chalmers, A.D., Strauss, B., and Papalopulu, N. (2003). Oriented cell divisions asymmetrically segregate aPKC and generate cell fate diversity in the early *Xenopus* embryo. *Development* 130, 2657-2668.

Chan, P., Gabay, M., Wright, F.A., and Tall, G.G. (2011). Ric-8B is a GTP-dependent G protein alphas guanine nucleotide exchange factor. *The Journal of biological chemistry* 286, 19932-19942.

Charoy, C., Nawabi, H., Reynaud, F., Derrington, E., Bozon, M., Wright, K., Falk, J., Helmbacher, F., Kindbeiter, K., and Castellani, V. (2012). gdnf Activates Midline Repulsion by Semaphorin3B via NCAM during Commissural Axon Guidance. *Neuron* 75, 1051-1066.

Chen, H., Chedotal, A., He, Z., Goodman, C.S., and Tessier-Lavigne, M. (1997). Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* 19, 547-559.

Chen, H., He, Z., Bagri, A., and Tessier-Lavigne, M. (1998). Semaphorin-neuropilin interactions underlying sympathetic axon responses to class III semaphorins. *Neuron* 21, 1283-1290.

Chen, R.H., Waters, J.C., Salmon, E.D., and Murray, A.W. (1996). Association of spindle assembly checkpoint component XMad2 with unattached kinetochores. *Science* 274, 242-246.

Chenn, A., and McConnell, S.K. (1995). Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* 82, 631-641.

Chitnis, A., and Kintner, C. (1996). Sensitivity of proneural genes to lateral inhibition affects the pattern of primary neurons in *Xenopus* embryos. *Development* 122, 2295-2301.

Christensen, C., Ambartsumian, N., Gilestro, G., Thomsen, B., Comoglio, P., Tamagnone, L., Guldborg, P., and Lukanidin, E. (2005). Proteolytic processing



converts the repelling signal Sema3E into an inducer of invasive growth and lung metastasis. *Cancer research* 65, 6167-6177.

Colombo, K., Grill, S.W., Kimple, R.J., Willard, F.S., Siderovski, D.P., and Gonczy, P. (2003). Translation of polarity cues into asymmetric spindle positioning in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Science* 300, 1957-1961.

Concha, M.L., and Adams, R.J. (1998). Oriented cell divisions and cellular morphogenesis in the zebrafish gastrula and neurula: a time-lapse analysis. *Development* 125, 983-994.

Couwenbergs, C., Labbe, J.C., Goulding, M., Marty, T., Bowerman, B., and Gotta, M. (2007). Heterotrimeric G protein signaling functions with dynein to promote spindle positioning in *C. elegans*. *The Journal of cell biology* 179, 15-22.

Cubas, P., de Celis, J.F., Campuzano, S., and Modolell, J. (1991). Proneural clusters of achaete-scute expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes & development* 5, 996-1008.

Culi, J., and Modolell, J. (1998). Proneural gene self-stimulation in neural precursors: an essential mechanism for sense organ development that is regulated by Notch signaling. *Genes & development* 12, 2036-2047.

D'Avino, P.P., Savoian, M.S., and Glover, D.M. (2005). Cleavage furrow formation and ingression during animal cytokinesis: a microtubule legacy. *Journal of cell science* 118, 1549-1558.

da Silva, S.M., and Vincent, J.P. (2007). Oriented cell divisions in the extending germband of *Drosophila*. *Development* 134, 3049-3054.

Davis, R.L., and Turner, D.L. (2001). Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* 20, 8342-8357.

Dechant, R., and Glotzer, M. (2003). Centrosome separation and central spindle assembly act in redundant pathways that regulate microtubule density and trigger cleavage furrow formation. *Developmental cell* 4, 333-344.

Dekanty, A., and Milan, M. (2011). The interplay between morphogens and tissue growth. *EMBO reports* 12, 1003-1010.

Del Bene, F., Wehman, A.M., Link, B.A., and Baier, H. (2008). Regulation of neurogenesis by interkinetic nuclear migration through an apical-basal notch gradient. *Cell* 134, 1055-1065.

den Elzen, N., Buttery, C.V., Maddugoda, M.P., Ren, G., and Yap, A.S. (2009). Cadherin adhesion receptors orient the mitotic spindle during symmetric cell division in mammalian epithelia. *Molecular biology of the cell* 20, 3740-3750.

Desai, A., and Mitchison, T.J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annual review of cell and developmental biology* 13, 83-117.

Dessaud, E., McMahon, A.P., and Briscoe, J. (2008). Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development* 135, 2489-2503.

Ding, H., Wang, F., Ding, X., Song, X., Lu, X., Zhang, K., Xiao, H., Ye, M., Chen, J., and Zhang, Q. (2008). Association study of semaphorin 5A with risk of Parkinson's disease in a Chinese Han population. *Brain research* 1245, 126-129.

Dow, L.E., Kauffman, J.S., Caddy, J., Zerbatis, K., Peterson, A.S., Jane, S.M., Russell, S.M., and Humbert, P.O. (2007). The tumour-suppressor Scribble dictates cell polarity during directed epithelial migration: regulation of Rho GTPase recruitment to the leading edge. *Oncogene* 26, 2272-2282.

Du, Q., and Macara, I.G. (2004). Mammalian Pins is a conformational switch that links NuMA to heterotrimeric G proteins. *Cell* 119, 503-516.



Eggert, U.S., Mitchison, T.J., and Field, C.M. (2006). Animal cytokinesis: from parts list to mechanisms. *Annual review of biochemistry* 75, 543-566.

Eichmann, A., Makinen, T., and Alitalo, K. (2005). Neural guidance molecules regulate vascular remodeling and vessel navigation. *Genes & development* 19, 1013-1021.

Eickholt, B.J., Walsh, F.S., and Doherty, P. (2002). An inactive pool of GSK-3 at the leading edge of growth cones is implicated in Semaphorin 3A signaling. *The Journal of cell biology* 157, 211-217.

Estivill-Torrus, G., Llebreg-Zayas, P., Matas-Rico, E., Santin, L., Pedraza, C., De Diego, I., Del Arco, I., Fernandez-Llebreg, P., Chun, J., and De Fonseca, F.R. (2008). Absence of LPA1 signaling results in defective cortical development. *Cereb Cortex* 18, 938-950.

Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.

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

Farah, M.H., Olson, J.M., Sucic, H.B., Hume, R.I., Tapscott, S.J., and Turner, D.L. (2000). Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development* 127, 693-702.

Feldheim, D.A., and O'Leary, D.D. (2010). Visual map development: bidirectional signaling, bifunctional guidance molecules, and competition. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a001768.

Filosa, S., Rivera-Perez, J.A., Gomez, A.P., Gansmuller, A., Sasaki, H., Behringer, R.R., and Ang, S.L. (1997). Goosecoid and HNF-3beta genetically interact to regulate neural tube patterning during mouse embryogenesis. *Development* 124, 2843-2854.

Fink, J., Carpi, N., Betz, T., Betard, A., Chebah, M., Azioune, A., Bornens, M., Sykes, C., Fetler, L., Cuvelier, D., *et al.* (2011). External forces control mitotic spindle positioning. *Nature cell biology* 13, 771-778.

Fiore, R., and Puschel, A.W. (2003). The function of semaphorins during nervous system development. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 8, s484-499.

Fischer, E., Legue, E., Doyen, A., Nato, F., Nicolas, J.F., Torres, V., Yaniv, M., and Pontoglio, M. (2006). Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. *Nature genetics* 38, 21-23.

Fish, J.L., Kosodo, Y., Enard, W., Paabo, S., and Huttner, W.B. (2006). *Aspm* specifically maintains symmetric proliferative divisions of neuroepithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 10438-10443.

Flanagan, J.G. (2006). Neural map specification by gradients. *Current opinion in neurobiology* 16, 59-66.

Fukata, Y., Itoh, T.J., Kimura, T., Menager, C., Nishimura, T., Shiromizu, T., Watanabe, H., Inagaki, N., Iwamatsu, A., Hotani, H., *et al.* (2002). CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nature cell biology* 4, 583-591.

Gagnon, M.L., Bielenberg, D.R., Gechtman, Z., Miao, H.Q., Takashima, S., Soker, S., and Klagsbrun, M. (2000). Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity.



Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *97*, 2573-2578.

Galli, M., and van den Heuvel, S. (2008). Determination of the cleavage plane in early *C. elegans* embryos. *Annual review of genetics* *42*, 389-411.

Gaspard, N., Gaillard, A., and Vanderhaeghen, P. (2009). Making cortex in a dish: in vitro corticogenesis from embryonic stem cells. *Cell Cycle* *8*, 2491-2496.

Gherardi, E., Love, C.A., Esnouf, R.M., and Jones, E.Y. (2004). The sema domain. *Current opinion in structural biology* *14*, 669-678.

Glotzer, M. (2001). Animal cell cytokinesis. *Annual review of cell and developmental biology* *17*, 351-386.

Godenschwege, T.A., and Murphey, R.K. (2009). Genetic interaction of Neuroglian and Semaphorin1a during guidance and synapse formation. *Journal of neurogenetics* *23*, 147-155.

Godin, J.D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B.C., Dietrich, P., Volvert, M.L., Guillemot, F., Dragatsis, I., *et al.* (2010). Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron* *67*, 392-406.

Godin, J.D., and Humbert, S. (2011). Mitotic spindle: focus on the function of huntingtin. *The international journal of biochemistry & cell biology* *43*, 852-856.

Gogondeau, D., and Basto, R. (2010). Centrioles in flies: the exception to the rule? *Seminars in cell & developmental biology* *21*, 163-173.

Goldstein, B., and Hird, S.N. (1996). Specification of the anteroposterior axis in *Caenorhabditis elegans*. *Development* *122*, 1467-1474.

Gonczy, P., and Rose, L.S. (2005). Asymmetric cell division and axis formation in the embryo. *WormBook : the online review of C elegans biology*, 1-20.

Gong, Y., Mo, C., and Fraser, S.E. (2004). Planar cell polarity signalling controls cell division orientation during zebrafish gastrulation. *Nature* *430*, 689-693.

Goode, B.L., and Eck, M.J. (2007). Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annual review of biochemistry* *76*, 593-627.

Gotta, M., Abraham, M.C., and Ahringer, J. (2001). CDC-42 controls early cell polarity and spindle orientation in *C. elegans*. *Current biology : CB* *11*, 482-488.

Gotta, M., Dong, Y., Peterson, Y.K., Lanier, S.M., and Ahringer, J. (2003). Asymmetrically distributed *C. elegans* homologs of AGS3/PINS control spindle position in the early embryo. *Current biology : CB* *13*, 1029-1037.

Gotz, M., and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* *6*, 777-788.

Green, R.A., Paluch, E., and Oegema, K. (2012). Cytokinesis in Animal Cells. *Annual review of cell and developmental biology*.

Grill, S.W., Howard, J., Schaffer, E., Stelzer, E.H., and Hyman, A.A. (2003). The distribution of active force generators controls mitotic spindle position. *Science* *301*, 518-521.

Hao, Y., Du, Q., Chen, X., Zheng, Z., Balsbaugh, J.L., Maitra, S., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Macara, I.G. (2010). Par3 controls epithelial spindle orientation by aPKC-mediated phosphorylation of apical Pins. *Current biology : CB* *20*, 1809-1818.

Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., and Huttner, W.B. (2004). Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 3196-3201.





He, Z., Wang, K.C., Koprivica, V., Ming, G., and Song, H.J. (2002). Knowing how to navigate: mechanisms of semaphorin signaling in the nervous system. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2002, re1.

Hecht, J.H., Weiner, J.A., Post, S.R., and Chun, J. (1996). Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *The Journal of cell biology* 135, 1071-1083.

Helms, A.W., and Johnson, J.E. (2003). Specification of dorsal spinal cord interneurons. *Current opinion in neurobiology* 13, 42-49.

Henderson, D.J., and Copp, A.J. (1997). Role of the extracellular matrix in neural crest cell migration. *Journal of anatomy* 191 ( Pt 4), 507-515.

Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J., and Ish-Horowicz, D. (1995). Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* 375, 787-790.

Hirata, J., Nakagoshi, H., Nabeshima, Y., and Matsuzaki, F. (1995). Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during *Drosophila* development. *Nature* 377, 627-630.

Holland, A.J., and Cleveland, D.W. (2009). Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 478-487.

Hu, C.K., Coughlin, M., and Mitchison, T.J. (2012). Midbody assembly and its regulation during cytokinesis. *Molecular biology of the cell* 23, 1024-1034.

Huttner, W.B., and Brand, M. (1997). Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells. *Current opinion in neurobiology* 7, 29-39.

Huttner, W.B., and Kosodo, Y. (2005). Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Current opinion in cell biology* 17, 648-657.

Hyman, A.A., and White, J.G. (1987). Determination of cell division axes in the early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of cell biology* 105, 2123-2135.

Iacopetti, P., Michelini, M., Stuckmann, I., Oback, B., Aaku-Saraste, E., and Huttner, W.B. (1999). Expression of the antiproliferative gene TIS21 at the onset of neurogenesis identifies single neuroepithelial cells that switch from proliferative to neuron-generating division. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 4639-4644.

Ikeshima-Kataoka, H., Skeath, J.B., Nabeshima, Y., Doe, C.Q., and Matsuzaki, F. (1997). Miranda directs Prospero to a daughter cell during *Drosophila* asymmetric divisions. *Nature* 390, 625-629.

Ishibashi, M., Moriyoshi, K., Sasai, Y., Shiota, K., Nakanishi, S., and Kageyama, R. (1994). Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. *The EMBO journal* 13, 1799-1805.

Izumi, Y., Ohta, N., Hisata, K., Raabe, T., and Matsuzaki, F. (2006). *Drosophila* Pins-binding protein Mud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization. *Nature cell biology* 8, 586-593.

Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2001). Asymmetric cell division in the *Drosophila* nervous system. *Nature reviews Neuroscience* 2, 772-779.

Janssen, B.J., Malinauskas, T., Weir, G.A., Cader, M.Z., Siebold, C., and Jones, E.Y. (2012). Neuropilins lock secreted semaphorins onto plexins in a ternary signaling complex. *Nature structural & molecular biology* 19, 1293-1299.

Jimenez, F., and Modolell, J. (1993). Neural fate specification in *Drosophila*. *Current opinion in genetics & development* 3, 626-632.



Joberty, G., Petersen, C., Gao, L., and Macara, I.G. (2000). The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nature cell biology* 2, 531-539.

Kaji, N., Muramoto, A., and Mizuno, K. (2008). LIM kinase-mediated cofilin phosphorylation during mitosis is required for precise spindle positioning. *The Journal of biological chemistry* 283, 4983-4992.

Katayama, K., Melendez, J., Baumann, J.M., Leslie, J.R., Chauhan, B.K., Nemkul, N., Lang, R.A., Kuan, C.Y., Zheng, Y., and Yoshida, Y. (2011). Loss of RhoA in neural progenitor cells causes the disruption of adherens junctions and hyperproliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 7607-7612.

Kawakami, A., Kitsukawa, T., Takagi, S., and Fujisawa, H. (1996). Developmentally regulated expression of a cell surface protein, neuropilin, in the mouse nervous system. *Journal of neurobiology* 29, 1-17.

Kiecker, C., and Lumsden, A. (2012). The role of organizers in patterning the nervous system. *Annual review of neuroscience* 35, 347-367.

Kieserman, E.K., and Wallingford, J.B. (2009). In vivo imaging reveals a role for Cdc42 in spindle positioning and planar orientation of cell divisions during vertebrate neural tube closure. *Journal of cell science* 122, 2481-2490.

Kikutani, H., Suzuki, K., and Kumanogoh, A. (2007). Immune semaphorins: increasing members and their diverse roles. *Advances in immunology* 93, 121-143.

Kirschner, M., and Mitchison, T. (1986). Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* 45, 329-342.

Kolodkin, A.L., Matthes, D.J., and Goodman, C.S. (1993). The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75, 1389-1399.

Koncina, E., Roth, L., Gonthier, B., and Bagnard, D. (2007). Role of semaphorins during axon growth and guidance. *Advances in experimental medicine and biology* 621, 50-64.

Konno, D., Shioi, G., Shitamukai, A., Mori, A., Kiyonari, H., Miyata, T., and Matsuzaki, F. (2008). Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nature cell biology* 10, 93-101.

Kosodo, Y., Roper, K., Haubensak, W., Marzesco, A.M., Corbeil, D., and Huttner, W.B. (2004). Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *The EMBO journal* 23, 2314-2324.

Kurz, T., Pintard, L., Willis, J.H., Hamill, D.R., Gonczy, P., Peter, M., and Bowerman, B. (2002). Cytoskeletal regulation by the Nedd8 ubiquitin-like protein modification pathway. *Science* 295, 1294-1298.

Lake, B.B., and Sokol, S.Y. (2009). Strabismus regulates asymmetric cell divisions and cell fate determination in the mouse brain. *The Journal of cell biology* 185, 59-66.

Lawson, A., Anderson, H., and Schoenwolf, G.C. (2001a). Cellular mechanisms of neural fold formation and morphogenesis in the chick embryo. *The Anatomical record* 262, 153-168.

Lawson, A., Colas, J.F., and Schoenwolf, G.C. (2001b). Classification scheme for genes expressed during formation and progression of the avian primitive streak. *The Anatomical record* 262, 221-226.

Lechler, T., and Fuchs, E. (2005). Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* 437, 275-280.



Lee, J.E., Hollenberg, S.M., Snider, L., Turner, D.L., Lipnick, N., and Weintraub, H. (1995). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268, 836-844.

Lee, K.J., Mendelsohn, M., and Jessell, T.M. (1998). Neuronal patterning by BMPs: a requirement for GDF7 in the generation of a discrete class of commissural interneurons in the mouse spinal cord. *Genes & development* 12, 3394-3407.

Lehtinen, M.K., Zappaterra, M.W., Chen, X., Yang, Y.J., Hill, A.D., Lun, M., Maynard, T., Gonzalez, D., Kim, S., Ye, P., *et al.* (2011). The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron* 69, 893-905.

Lew, J., Qi, Z., Huang, Q.Q., Paudel, H., Matsuura, I., Matsushita, M., Zhu, X., and Wang, J.H. (1995). Structure, function, and regulation of neuronal Cdc2-like protein kinase. *Neurobiology of aging* 16, 263-268; discussion 268-270.

Lewis, J. (1998). Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates. *Seminars in cell & developmental biology* 9, 583-589.

Li, R., and Murray, A.W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 66, 519-531.

Li, W., Kale, A., and Baker, N.E. (2009). Oriented cell division as a response to cell death and cell competition. *Current biology : CB* 19, 1821-1826.

Li, X., and Nicklas, R.B. (1995). Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. *Nature* 373, 630-632.

Lo, L., Tiveron, M.C., and Anderson, D.J. (1998). MASH1 activates expression of the paired homeodomain transcription factor Phox2a, and couples pan-neuronal and subtype-specific components of autonomic neuronal identity. *Development* 125, 609-620.

Lu, B., Jan, L., and Jan, Y.N. (2000). Control of cell divisions in the nervous system: symmetry and asymmetry. *Annual review of neuroscience* 23, 531-556.

Lu, B., Usui, T., Uemura, T., Jan, L., and Jan, Y.N. (1999). Flamingo controls the planar polarity of sensory bristles and asymmetric division of sensory organ precursors in *Drosophila*. *Current biology : CB* 9, 1247-1250.

Luo, Y., Raible, D., and Raper, J.A. (1993). Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75, 217-227.

Lupo, G., Harris, W.A., and Lewis, K.E. (2006). Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nature reviews Neuroscience* 7, 103-114.

Ma, Q., Kintner, C., and Anderson, D.J. (1996). Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87, 43-52.

Markus, S.M., and Lee, W.L. (2011). Microtubule-dependent path to the cell cortex for cytoplasmic dynein in mitotic spindle orientation. *Bioarchitecture* 1, 209-215.

Marti, E., Takada, R., Bumcrot, D.A., Sasaki, H., and McMahon, A.P. (1995). Distribution of Sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo. *Development* 121, 2537-2547.

Matthews, L.R., Carter, P., Thierry-Mieg, D., and Kemphues, K. (1998). ZYG-9, a *Caenorhabditis elegans* protein required for microtubule organization and function, is a component of meiotic and mitotic spindle poles. *The Journal of cell biology* 141, 1159-1168.

Mauti, O., Sadhu, R., Gemayel, J., Gesemann, M., and Stoeckli, E.T. (2006). Expression patterns of plexins and neuropilins are consistent with cooperative and separate functions during neural development. *BMC developmental biology* 6, 32.

Merdes, A., Ramyar, K., Vechio, J.D., and Cleveland, D.W. (1996). A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly. *Cell* 87, 447-458.



Meunier, S., and Vernos, I. (2012). Microtubule assembly during mitosis - from distinct origins to distinct functions? *Journal of cell science*.

Miller, K.G., and Rand, J.B. (2000). A role for RIC-8 (Synembryn) and GOA-1 (G(o)alpha) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *156*, 1649-1660.

Mitsui, N., Inatome, R., Takahashi, S., Goshima, Y., Yamamura, H., and Yanagi, S. (2002). Involvement of Fes/Fps tyrosine kinase in semaphorin3A signaling. *The EMBO journal* *21*, 3274-3285.

Moret, F., Guiland, J.C., Coudouel, S., Rochette, L., and Vernier, P. (2004). Distribution of tyrosine hydroxylase, dopamine, and serotonin in the central nervous system of amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*): implications for the evolution of catecholamine systems in vertebrates. *The Journal of comparative neurology* *468*, 135-150.

Morin, X., and Bellaiche, Y. (2011). Mitotic spindle orientation in asymmetric and symmetric cell divisions during animal development. *Developmental cell* *21*, 102-119.

Morin, X., Jaouen, F., and Durbec, P. (2007). Control of planar divisions by the G-protein regulator LGN maintains progenitors in the chick neuroepithelium. *Nature neuroscience* *10*, 1440-1448.

Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., *et al.* (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* *58*, 537-544.

Musacchio, A. (2011). Spindle assembly checkpoint: the third decade. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* *366*, 3595-3604.

Na, J., and Zernicka-Goetz, M. (2006). Asymmetric positioning and organization of the meiotic spindle of mouse oocytes requires CDC42 function. *Current biology : CB* *16*, 1249-1254.

Nakamura, F., Tanaka, M., Takahashi, T., Kalb, R.G., and Strittmatter, S.M. (1998). Neuropilin-1 extracellular domains mediate semaphorin D/III-induced growth cone collapse. *Neuron* *21*, 1093-1100.

Nawabi, H., Briancon-Marjollet, A., Clark, C., Sanyas, I., Takamatsu, H., Okuno, T., Kumanogoh, A., Bozon, M., Takeshima, K., Yoshida, Y., *et al.* (2010). A midline switch of receptor processing regulates commissural axon guidance in vertebrates. *Genes & development* *24*, 396-410.

Nieto, M., Schuurmans, C., Britz, O., and Guillemot, F. (2001). Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* *29*, 401-413.

Niquille, M., Garel, S., Mann, F., Hornung, J.P., Otsmane, B., Chevalley, S., Parras, C., Guillemot, F., Gaspar, P., Yanagawa, Y., *et al.* (2009). Transient neuronal populations are required to guide callosal axons: a role for semaphorin 3C. *PLoS biology* *7*, e1000230.

Nishimura, T., and Kaibuchi, K. (2007). Numb controls integrin endocytosis for directional cell migration with aPKC and PAR-3. *Developmental cell* *13*, 15-28.

Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V., and Kriegstein, A.R. (2008). Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *The Journal of comparative neurology* *508*, 28-44.

O'Connell, C.B., and Wang, Y.L. (2000). Mammalian spindle orientation and position respond to changes in cell shape in a dynein-dependent fashion. *Molecular biology of the cell* *11*, 1765-1774.





O'Connell, K.F., Maxwell, K.N., and White, J.G. (2000). The *spd-2* gene is required for polarization of the anteroposterior axis and formation of the sperm asters in the *Caenorhabditis elegans* zygote. *Developmental biology* 222, 55-70.

Panbianco, C., Weinkove, D., Zanin, E., Jones, D., Divecha, N., Gotta, M., and Ahringer, J. (2008). A casein kinase 1 and PAR proteins regulate asymmetry of a PIP(2) synthesis enzyme for asymmetric spindle positioning. *Developmental cell* 15, 198-208.

Park, D.H., and Rose, L.S. (2008). Dynamic localization of LIN-5 and GPR-1/2 to cortical force generation domains during spindle positioning. *Developmental biology* 315, 42-54.

Pease, J.C., and Tirnauer, J.S. (2011). Mitotic spindle misorientation in cancer--out of alignment and into the fire. *Journal of cell science* 124, 1007-1016.

Perris, R., and Johansson, S. (1990). Inhibition of neural crest cell migration by aggregating chondroitin sulfate proteoglycans is mediated by their hyaluronan-binding region. *Developmental biology* 137, 1-12.

Perris, R., Paulsson, M., and Bronner-Fraser, M. (1989). Molecular mechanisms of avian neural crest cell migration on fibronectin and laminin. *Developmental biology* 136, 222-238.

Perron, M., and Harris, W.A. (2000). Determination of vertebrate retinal progenitor cell fate by the Notch pathway and basic helix-loop-helix transcription factors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 57, 215-223.

Peters, J.M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 644-656.

Peyre, E., Jaouen, F., Saadaoui, M., Haren, L., Merdes, A., Durbec, P., and Morin, X. (2011). A lateral belt of cortical LGN and NuMA guides mitotic spindle movements and planar division in neuroepithelial cells. *The Journal of cell biology* 193, 141-154.

Pinsky, B.A., and Biggins, S. (2005). The spindle checkpoint: tension versus attachment. *Trends in cell biology* 15, 486-493.

Postiglione, M.P., Juschke, C., Xie, Y., Haas, G.A., Charalambous, C., and Knoblich, J.A. (2011). Mouse *inscuteable* induces apical-basal spindle orientation to facilitate intermediate progenitor generation in the developing neocortex. *Neuron* 72, 269-284.

Poulson, N.D., and Lechler, T. (2010). Robust control of mitotic spindle orientation in the developing epidermis. *The Journal of cell biology* 191, 915-922.

Qiu, R., Wang, X., Davy, A., Wu, C., Murai, K., Zhang, H., Flanagan, J.G., Soriano, P., and Lu, Q. (2008). Regulation of neural progenitor cell state by ephrin-B. *The Journal of cell biology* 181, 973-983.

Quesada-Hernandez, E., Caneparo, L., Schneider, S., Winkler, S., Liebling, M., Fraser, S.E., and Heisenberg, C.P. (2010). Stereotypical cell division orientation controls neural rod midline formation in zebrafish. *Current biology : CB* 20, 1966-1972.

Rapaport, D.H., Patheal, S.L., and Harris, W.A. (2001). Cellular competence plays a role in photoreceptor differentiation in the developing *Xenopus* retina. *Journal of neurobiology* 49, 129-141.

Rogulja, D., Rauskolb, C., and Irvine, K.D. (2008). Morphogen control of wing growth through the Fat signaling pathway. *Developmental cell* 15, 309-321.

Rossignol, M., Gagnon, M.L., and Klagsbrun, M. (2000). Genomic organization of human neuropilin-1 and neuropilin-2 genes: identification and distribution of splice variants and soluble isoforms. *Genomics* 70, 211-222.



Roszko, I., Afonso, C., Henrique, D., and Mathis, L. (2006). Key role played by RhoA in the balance between planar and apico-basal cell divisions in the chick neuroepithelium. *Developmental biology* 298, 212-224.

Roth, L., Koncina, E., Satkauskas, S., Cremel, G., Aunis, D., and Bagnard, D. (2009). The many faces of semaphorins: from development to pathology. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66, 649-666.

Roztocil, T., Matter-Sadzinski, L., Alliod, C., Ballivet, M., and Matter, J.M. (1997). NeuroM, a neural helix-loop-helix transcription factor, defines a new transition stage in neurogenesis. *Development* 124, 3263-3272.

Saburi, S., Hester, I., Fischer, E., Pontoglio, M., Eremina, V., Gessler, M., Quaggin, S.E., Harrison, R., Mount, R., and McNeill, H. (2008). Loss of Fat4 disrupts PCP signaling and oriented cell division and leads to cystic kidney disease. *Nature genetics* 40, 1010-1015.

Sadanandam, A., Rosenbaugh, E.G., Singh, S., Varney, M., and Singh, R.K. (2010). Semaphorin 5A promotes angiogenesis by increasing endothelial cell proliferation, migration, and decreasing apoptosis. *Microvascular research* 79, 1-9.

Sakaue-Sawano, A., Ohtawa, K., Hama, H., Kawano, M., Ogawa, M., and Miyawaki, A. (2008). Tracing the silhouette of individual cells in S/G2/M phases with fluorescence. *Chemistry & biology* 15, 1243-1248.

Sanada, K., and Tsai, L.H. (2005). G protein betagamma subunits and AGS3 control spindle orientation and asymmetric cell fate of cerebral cortical progenitors. *Cell* 122, 119-131.

Sanyas, I., Bozon, M., Moret, F., and Castellani, V. (2012a). Motoneuronal Sema3C is essential for setting stereotyped motor tract positioning in limb-derived chemotropic semaphorins. *Development* 139, 3633-3643.

Sanyas, I., Bozon, M., Moret, F., and Castellani, V. (2012b). Motoneuronal Sema3C is essential for setting stereotyped motor tract positioning in limb-derived chemotropic semaphorins. *Development*.

Sasaki, Y., Cheng, C., Uchida, Y., Nakajima, O., Ohshima, T., Yagi, T., Taniguchi, M., Nakayama, T., Kishida, R., Kudo, Y., *et al.* (2002). Fyn and Cdk5 mediate semaphorin-3A signaling, which is involved in regulation of dendrite orientation in cerebral cortex. *Neuron* 35, 907-920.

Sauer, M.E., and Chittenden, A.C. (1959). Deoxyribonucleic acid content of cell nuclei in the neural tube of the chick embryo: evidence for intermitotic migration of nuclei. *Experimental cell research* 16, 1-6.

Schaefer, M., Petronczki, M., Dorner, D., Forte, M., and Knoblich, J.A. (2001). Heterotrimeric G proteins direct two modes of asymmetric cell division in the *Drosophila* nervous system. *Cell* 107, 183-194.

Schober, M., Schaefer, M., and Knoblich, J.A. (1999). Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 402, 548-551.

Schoenwolf, G.C. (1988). Microsurgical analyses of avian neurulation: separation of medial and lateral tissues. *The Journal of comparative neurology* 276, 498-507.

Schoenwolf, G.C., and Alvarez, I.S. (1989). Roles of neuroepithelial cell rearrangement and division in shaping of the avian neural plate. *Development* 106, 427-439.

Schoenwolf, G.C., Everaert, S., Bortier, H., and Vakaet, L. (1989). Neural plate- and neural tube-forming potential of isolated epiblast areas in avian embryos. *Anatomy and embryology* 179, 541-549.



Schoenwolf, G.C., and Franks, M.V. (1984). Quantitative analyses of changes in cell shapes during bending of the avian neural plate. *Developmental biology* 105, 257-272.

Segalen, M., and Bellaiche, Y. (2009). Cell division orientation and planar cell polarity pathways. *Seminars in cell & developmental biology* 20, 972-977.

Segalen, M., Johnston, C.A., Martin, C.A., Dumortier, J.G., Prehoda, K.E., David, N.B., Doe, C.Q., and Bellaiche, Y. (2010). The Fz-Dsh planar cell polarity pathway induces oriented cell division via Mud/NuMA in *Drosophila* and zebrafish. *Developmental cell* 19, 740-752.

Shelly, M., Cancedda, L., Lim, B.K., Popescu, A.T., Cheng, P.L., Gao, H., and Poo, M.M. (2011). Semaphorin3A regulates neuronal polarization by suppressing axon formation and promoting dendrite growth. *Neuron* 71, 433-446.

Shen, C.P., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1997). Miranda is required for the asymmetric localization of Prospero during mitosis in *Drosophila*. *Cell* 90, 449-458.

Shimizu, A., Mammoto, A., Italiano, J.E., Jr., Pravda, E., Dudley, A.C., Ingber, D.E., and Klagsbrun, M. (2008). ABL2/ARG tyrosine kinase mediates SEMA3F-induced RhoA inactivation and cytoskeleton collapse in human glioma cells. *The Journal of biological chemistry* 283, 27230-27238.

Shimojo, H., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2008). Oscillations in notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. *Neuron* 58, 52-64.

Shitamukai, A., Konno, D., and Matsuzaki, F. (2011). Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer subventricular zone progenitors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 3683-3695.

Shitamukai, A., and Matsuzaki, F. (2012). Control of asymmetric cell division of mammalian neural progenitors. *Development, growth & differentiation* 54, 277-286.

Siller, K.H., Cabernard, C., and Doe, C.Q. (2006). The NuMA-related Mud protein binds Pins and regulates spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Nature cell biology* 8, 594-600.

Simons, M., and Mlodzik, M. (2008). Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annual review of genetics* 42, 517-540.

Skeath, J.B., and Carroll, S.B. (1992). Regulation of proneural gene expression and cell fate during neuroblast segregation in the *Drosophila* embryo. *Development* 114, 939-946.

Smart, I.H. (1973). Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the mouse neocortex: a pilot study based on recording the number, location and plane of cleavage of mitotic figures. *Journal of anatomy* 116, 67-91.

Spana, E.P., and Doe, C.Q. (1996). Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates. *Neuron* 17, 21-26.

Strome, S. (1993). Determination of cleavage planes. *Cell* 72, 3-6.

Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M.Z., Zubiaga, A., Hua, X., Fan, G., and Greenberg, M.E. (2001). Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104, 365-376.

Takahashi, K., Ishida, M., Hirokawa, K., and Takahashi, H. (2008). Expression of the semaphorins Sema 3D and Sema 3F in the developing parathyroid and thymus. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 237, 1699-1708.



Takeuchi, K., and Fukagawa, T. (2012). Molecular architecture of vertebrate kinetochores. *Experimental cell research* 318, 1367-1374.

Tamagnone, L., Artigiani, S., Chen, H., He, Z., Ming, G.I., Song, H., Chedotal, A., Winberg, M.L., Goodman, C.S., Poo, M., *et al.* (1999). Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99, 71-80.

Thery, M., Jimenez-Dalmaroni, A., Racine, V., Bornens, M., and Julicher, F. (2007). Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation. *Nature* 447, 493-496.

Tillo, M., Ruhrberg, C., and Mackenzie, F. (2012). Emerging roles for semaphorins and VEGFs in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Cell Adh Migr* 6.

Tree, D.R., Ma, D., and Axelrod, J.D. (2002). A three-tiered mechanism for regulation of planar cell polarity. *Seminars in cell & developmental biology* 13, 217-224.

Tsou, M.F., Ku, W., Hayashi, A., and Rose, L.S. (2003). PAR-dependent and geometry-dependent mechanisms of spindle positioning. *The Journal of cell biology* 160, 845-855.

Turner, L.J., Nicholls, S., and Hall, A. (2004). The activity of the plexin-A1 receptor is regulated by Rac. *The Journal of biological chemistry* 279, 33199-33205.

Uchida, Y., and Goshima, Y. (2005). [Molecular mechanism of axon guidance mediated by phosphorylation of CRMP2]. *Seikagaku The Journal of Japanese Biochemical Society* 77, 1424-1427.

Uchida, Y., Ohshima, T., Sasaki, Y., Suzuki, H., Yanai, S., Yamashita, N., Nakamura, F., Takei, K., Ihara, Y., Mikoshiba, K., *et al.* (2005). Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3beta phosphorylation of CRMP2: implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 10, 165-179.

Urbani, L., and Stearns, T. (1999). The centrosome. *Current biology : CB* 9, R315-317.

Vikis, H.G., Li, W., He, Z., and Guan, K.L. (2000). The semaphorin receptor plexin-B1 specifically interacts with active Rac in a ligand-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 12457-12462.

von Philipsborn, A., and Bastmeyer, M. (2007). Mechanisms of gradient detection: a comparison of axon pathfinding with eukaryotic cell migration. *International review of cytology* 263, 1-62.

Walczak, C.E., and Heald, R. (2008). Mechanisms of mitotic spindle assembly and function. *International review of cytology* 265, 111-158.

Wang, X., Tsai, J.W., Imai, J.H., Lian, W.N., Vallee, R.B., and Shi, S.H. (2009). Asymmetric centrosome inheritance maintains neural progenitors in the neocortex. *Nature* 461, 947-955.

Wang, Y., and Burke, D.J. (1995). Checkpoint genes required to delay cell division in response to nocodazole respond to impaired kinetochore function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 15, 6838-6844.

Wang, Y., and Nathans, J. (2007). Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. *Development* 134, 647-658.

Wilcock, A.C., Swedlow, J.R., and Storey, K.G. (2007). Mitotic spindle orientation distinguishes stem cell and terminal modes of neuron production in the early spinal cord. *Development* 134, 1943-1954.

Winey, M., and Bloom, K. (2012). Mitotic spindle form and function. *Genetics* 190, 1197-1224.





Wodarz, A., and Huttner, W.B. (2003). Asymmetric cell division during neurogenesis in *Drosophila* and vertebrates. *Mechanisms of development* *120*, 1297-1309.

Wodarz, A., Ramrath, A., Kuchinke, U., and Knust, E. (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* *402*, 544-547.

Yazdani, U., and Terman, J.R. (2006). The semaphorins. *Genome biology* *7*, 211.

Yingling, J., Youn, Y.H., Darling, D., Toyo-Oka, K., Pramparo, T., Hirotsune, S., and Wynshaw-Boris, A. (2008). Neuroepithelial stem cell proliferation requires LIS1 for precise spindle orientation and symmetric division. *Cell* *132*, 474-486.

Yu, F., Morin, X., Cai, Y., Yang, X., and Chia, W. (2000). Analysis of partner of inscuteable, a novel player of *Drosophila* asymmetric divisions, reveals two distinct steps in inscuteable apical localization. *Cell* *100*, 399-409.

Zallen, J.A. (2007). Planar polarity and tissue morphogenesis. *Cell* *129*, 1051-1063.

Zappaterra, M.W., and Lehtinen, M.K. (2012). The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior, and beyond. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *69*, 2863-2878.

Zigman, M., Trinh le, A., Fraser, S.E., and Moens, C.B. (2011). Zebrafish neural tube morphogenesis requires Scribble-dependent oriented cell divisions. *Current biology : CB* *21*, 79-86.

Zou, Y., Stoeckli, E., Chen, H., and Tessier-Lavigne, M. (2000). Squeezing axons out of the gray matter: a role for slit and semaphorin proteins from midline and ventral spinal cord. *Cell* *102*, 363-375.

