



Rôle du cil primaire dans la migration des neuroblastes du courant de migration rostrale

Maxime Chaulet

► To cite this version:

Maxime Chaulet. Rôle du cil primaire dans la migration des neuroblastes du courant de migration rostrale. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS191 . tel-02932151

HAL Id: tel-02932151

<https://theses.hal.science/tel-02932151>

Submitted on 7 Sep 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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale n°158 Cerveau-Cognition-Comportement (ED3C)

CNRS 8246, INSERM U1130, Laboratoire Neurosciences Paris Seine

Equipe développement et plasticité des réseaux de neurones

Rôle du cil primaire dans la migration des neuroblastes du courant de migration rostrale

Par Maxime Chaulet

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par Isabelle Caillé

Présentée et soutenue publiquement le 24 Septembre 2019

Devant un jury composé de :

Dr. Evelyne Bloch-Gallego, Directrice de Recherche

Rapporteuse

Pr. Bénédicte Durand, Directrice de Recherche

Rapporteuse

Dr. Nathalie Spassky, Directrice de Recherche

Examinatrice

Dr. Sylvie Schneider-Maunoury, Directrice de Recherche

Examinatrice

Dr. Alexandre Baffet, Chargé de Recherche

Examineur

Dr Isabelle Caillé, Maître de Conférences

Directrice de thèse

RÉSUMÉ

Le cil primaire est un petit organe sensoriel en forme de bâtonnet connecté au centrosome qui émerge de la surface de la plupart des cellules eucaryotes. Il joue un rôle fondamental dans de multiples étapes du développement du système nerveux. L'objectif de cette thèse a été de mieux comprendre le rôle du cil primaire dans la migration neuronale. Notre modèle d'étude de la migration est la migration tangentielle depuis la zone sous-ventriculaire vers le bulbe olfactif le long du courant de migration rostral (CMR), qui est présent dans la souris postnatale et persiste chez l'adulte. Les neurones du CMR présentent une migration saltatoire alternant pause et nucléokinèse (NK) avec un mouvement stéréotypé de leur centrosome. Nous analysons la migration et la dynamique du centrosome par vidéo-microscopie sur tranche de cerveau vivant, technique que j'ai mise au point dans le laboratoire.

Dans une première étude descriptive, nous nous sommes intéressés aux différences de migration existant entre la migration postnatale et la migration du jeune adulte souvent considérées comme équivalentes dans la littérature, alors même que le CMR montre des changements morphologiques importants dans les trois premières semaines de vie. Nous avons observé que la vitesse de migration et les paramètres de NK étaient similaires entre P10 et P30. En revanche, les paramètres de directionnalité sont modifiés suggérant de possibles différences dans les mécanismes de guidage. Pour analyser un possible rôle différentiel du cil primaire à P10 et P30, nous avons réalisé une ablation génétique du cil primaire par injection de Cre recombinase dans une lignée *Kif3a^{lox/lox}*. Cette ablation produit des effets différents à P10 et P30: à P10, elle affecte la vitesse et le rythme de NK ainsi que la directionnalité alors qu'à P30, elle affecte seulement les paramètres de directionnalité. Ces résultats (qui restent préliminaires) suggèrent que le cil primaire pourrait avoir des rôles différents à ces deux âges.

Dans une deuxième étude, mon travail a convergé avec celui d'une autre étudiante en thèse vers l'analyse de la dynamique de la signalisation AMPc dans les neurones en migration. Pour cela, nous imageons un biosenseur FRET AMPc spécifique par microscopie biphotonique sur tranche. Cette technique a révélé, dans les neurones du CMR à P10, un hotspot dynamique d'AMPc co-migrant avec le centrosome, présent pendant la NK et absent pendant les pauses. L'ablation génétique du cil ainsi que le knock-down de l'adénylate cyclase 3 ciliaire mènent à la disparition du hotspot. Cette disparition résulte en un ralentissement de la migration avec un allongement des phases de pause et une fréquence de NK diminuée. De plus, ces modifications de la migration sont accompagnées par des défauts de dynamique centrosomale avec une vitesse du centrosome réduite, une diminution de la distance maximale entre noyau et centrosome et un découplage entre mouvement du centrosome et NK. Par ailleurs, une délocalisation génétique de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) centrosomale récapitule ces phénotypes de migration, ce qui suggère qu'elle est la protéine effectrice

du hotspot d'AMPC. Nos données montrent donc que l'AMPC produit dans le cil forme un hotspot dynamique au niveau du centrosome qui agit localement sur la PKA centrosomale pour réguler la migration neuronale et le couplage centrosome/noyau. Il s'agit d'une régulation largement utilisée par les neurones en migration puisque nous retrouvons ce hotspot dans les neurones en migration radiaire dans le bulbe olfactif, dans le CMR du jeune adulte et dans les neurones en migration radiaire du cortex embryonnaire.

Cette étude va prochainement être soumise pour publication dans un article intitulé "Compartmentalized cAMP dynamics regulates neuronal migration" où je suis co-premier auteur.

L'ensemble de ce travail amène un nouveau point de vue sur le mécanisme cellulaire par lequel le cil primaire régule la migration neuronale. Nous suggérons que la signalisation au niveau du cil primaire a une influence directe sur le centrosome et l'organisation des microtubules. Dans ce contexte, le cil primaire n'apparaît donc plus comme une unité de signalisation distincte mais plutôt comme directement couplé au centrosome via la diffusion de l'AMPC jusqu'à celui-ci, ce qui permettrait de réguler directement la dynamique du centrosome et celle des microtubules.

REMERCIEMENTS

Je remercie Evelyne Bloch-Gallego, Bénédicte Durand, Nathalie Spassky, Sylvie Schneider-Maunoury et Alexandre Baffet de me faire l'honneur de faire partie de mon jury de thèse.

Je veux d'abord remercier une personne, Isabelle. Tu m'as accueilli en Juillet après que je me sois retrouvé sans stage de M2 et depuis tu n'as cessé de m'enseigner ta vision de la science. Tu es une femme passionnée, jamais à court d'excellentes idées. Jamais à court de motivation non plus, tu m'as toujours poussé à aller plus loin et à ne jamais baisser les bras même après une montagne d'échecs (Pour les IFT88, quand ça ne marchait pas au bi-photon ou même pour la révélation BATGal, ...). Et même quand il ne s'agissait pas de science, tu étais toujours ouverte à la discussion sur tout et sur rien. Sans parler de toutes les conversations autour du foot durant lesquelles tu as toujours tenté de comprendre ma folie pour ce sport et ce club ! Bref pour tout ça, merci, merci beaucoup et... Poudre de Licorne !!!

Merci Julie, ma collègue et plus certainement encore ma binôme. J'ai adoré partager avec toi ces trois dernières années. On a sacrément rigolé, on en a fait des conneries aussi mais par-dessus tout, on a formé un sacré duo de choc à tout épreuve, surtout du chocolat et des bonbons ! Et puis, j'ai trouvé une véritable amie avec qui je peux discuter et blablater (sauf du foot, faut pas déconner) et je t'en remercie. Tu as eu le mérite de me supporter moi, mes blagues et mon foot pendant trois ans et rien que ça, tu mérites une médaille ! Haha

Je ne te demanderais qu'une chose, continue en science s'il te plait, tu es une scientifique hors-pair, passionnée et douée qui arrive à trouver des aiguilles dans des meules de foin de publications. Tu feras une excellente chercheuse et tu vas me manquer !

Merci Alain et Isabelle, vous m'avez accueilli dans votre équipe et vous avez réussi à répondre à toutes mes petites questions quand vous trouviez le temps.

Merci Coralie. Tu es une collègue formidable, toujours à l'écoute et avec une expérience technique tellement impressionnante !! Une pierre précieuse du labo qui tourne au coca...Je me souviendrais toujours du premier conseil reçu en arrivant dans ce labo, « quand tu as une question, demande à Coralie, elle saura te répondre ».

Merci Oriane. Tout comme Julie, en plus d'une collègue géniale, j'ai trouvé une amie adorable toujours prête à écouter et à discuter pour trouver une solution ou pour juste discuter entre deux manips et rigoler. Peut-être même tester une ou deux blagues (non elles n'étaient pas pourries !!).

Merci Orianette. Parmi toutes les personnes que j'ai rencontré durant ma thèse, tu es l'une des plus chère. Merci pour tous ces sourires, tous ces rires et toutes ces discussions au bureau, en paillasse mais surtout en mangeant. T'as supporté jusqu'au bout mes blagues et franchement bravo, ce n'était pas simple du tout alors même que nous n'étions pas dans la même pièce ! Il va falloir que je me trouve une nouvelle complice de blague maintenant ! Merci pour tous les bonbons et les gâteaux, tu m'as littéralement nourri durant la thèse !

Merci Caro. Tu as toujours été adorable et souriante, toujours disponible pour des questions ou des petites blagues. J'espère que tu ne les auras pas toutes noté d'ailleurs, j'ai peur que tu deviennes comme moi après.

Merci Marie-Pierre pour tes connaissances dans les souris et tes réponses à toutes mes petites questions de labo et également bizarres que je pouvais te poser.

Merci Mohamed pour ton expertise pour les statistiques, tu as su nous expliquer l'univers des stats...un véritable Mozart des chiffres et une personne adorable toujours prête à aider.

Merci Maryse, tu es toujours souriante et toujours adorable. Une bonne journée ne commence jamais sans ton bonjour. Ton aide au labo est précieuse et indispensable.

Merci aux anciens, Laura et Quentin et merci à toutes les personnes de passage dans le labo et notamment Margaux et Sarujan. Merci pour toutes les petites conversations de bout de paillasse et tous les rires qu'on a eu ensemble. Je vous souhaite un bon courage pour la suite. Bon courage Salima, tu as brillamment réussi le concours et tu vas découvrir le monde de la thèse, accroches toi, c'est tellement enrichissant.

Merci aux autres personnes du B6 : Pierre, Éric, Célia, Elia, Ségolène, Lise, Yohan, Francesca, Aurélie, Morgane et tous ceux qui sont partis mais que j'ai eu le temps de

connaître. Le B6 est une famille un peu bizarre mais elle est cool et toujours au top quand il s'agit d'un peu d'aide ou d'une discussion à la cafét'.

Merci à la plateforme d'imagerie : Suzanne, France et Jean-François. Vous avez toujours été là pour répondre à mes questions, me conseiller ou même pour une petite discussion sympathique entre deux acquisitions. Mon travail de thèse n'aurait pas pu aboutir sans vos doigts de fée ni votre gentillesse. Vous êtes formidables. Une petite pensée pour ce bi-photon noyé si jeune...

Merci au club IDPC. On a passé une année incroyable ensemble. Ça été une expérience folle de vous côtoyer et de vous connaître, j'ai rencontré des gens adorables. On aura bien rigolé durant toutes ces réunions de Bee...Friday session pardon 😊. Les Friday sessions n'auront jamais été aussi réussies qu'avec vous et vous avez géré l'organisation de la retraite comme jaja, vous allez me manquer !

Merci Arturo. On a organisé la plus belle coupe du monde et les meilleurs Friday sessions ensemble. Tu es un mec en or et j'espère que ta carrière sera riche de belles découvertes. Bon courage pour la suite de ta vie mon pote. Il va falloir que je me trouve un autre partenaire de foot après toutes ces belles discussions autour du ballon rond !

Claire...Après toutes ces journées que tu as enduré à mes côtés, je n'allais certainement pas t'oublier. Merci pour ta gentillesse, ton sourire, tes conseils et ton écoute, merci pour tous les fous rires qu'on aura eu ensemble durant les TPs ou au labo. Tu es exceptionnelle et j'espère que tu réussiras par la suite, des femmes comme toi en science, il en faut. J'ai trouvé une véritable amie aussi et tu vas me manquer.

Merci aux gens de VMVDC : Claire, Elia, Gabrielle, Léonor, Marie-Thérèse et PierBruno. C'était une aventure un peu folle, une bulle à part dans la thèse. On a passé de sacrés bons moments et c'était une super expérience d'enseigner à vos côtés.

Merci à tous les autres, ceux que je croise rarement ou ceux que je croise plus souvent et avec qui je tape un bout de discut' dans le couloir : Benjamin, Elise, Gab, Pierre, Josquin, Cuong, Hervé, Steve, Sophie, Anne-Claire, et tous ceux que j'oublie malheureusement.

Merci à mes parents, ma sœur et Nicolas. Vous m'avez soutenu dans les moments compliqués et encouragé dans les moments de joie. Je suis l'homme que je suis aujourd'hui grâce à vous et je vous dois beaucoup. Je vous dédie cette thèse car je l'ai réussi avec vous. Je ne vous le dis pas assez mais je vous aime tendrement.

Merci mon petit chat. Tu as débarqué dans ma vie sans prévenir et démarrer cette nouvelle aventure avec toi m'a fait énormément de bien. Tu es une vraie petite dose de bonheur et de tendresse à chaque fois que je te vois. Merci pour ton énorme soutien et les encouragements que tu m'as donné depuis le début ma petite blonde. Je t'aime.

Merci aux meilleurs, mes potos Ludo, Nouch, Chlou et Marionnette. On se connaît depuis le début et on a tout vécu mais même si on fait maintenant des choses chacun de notre côté, on reste uni. J'en suis là grâce à vous aussi, vous m'avez supporté, engueulé, encouragé, félicité autant que vous pouviez et je vous dois aussi cette réussite. Je vous kiffe, je vous aime, cœur cœur love sur vous !

Merci aussi à ma clique de fac : Léo, Alison, Clément, Blaise, Charlotte, Andry, Sarah, Raith. On en a bavé ensemble pendant le Master, on a rincé les boxes de la BU du matin au soir pour les examens et pendant les cours. On y est arrivé, on va l'avoir cette thèse !!! Vous êtes juste incroyable, merci pour tous ces moments passés à la fac ou dans les bars.

Petite dédicace spéciale pour toi Léo, mon pote, mon supporter parisien préféré, mon mentor de krav, on s'était promis d'avoir une thèse, on s'est tellement pris la tête en cours ou pour une présentation d'article pour des questions dont on a le secret et qu'on peut résumer avec un simple regard maintenant. Souviens-toi de ce lendemain de huitième de finale contre Chelsea, la meilleure présentation d'article qu'on a jamais fait et qu'on ne fera jamais plus 😊
Si je suis arrivé jusque-là c'est aussi grâce à toi mon gars.

Merci à l'ECKM pour tous ces entraînements ! Un esprit sain dans un corps sain qu'ils disaient mais ça fait tellement de bien de tout relâcher et tout donner à la sueur de son front. Merci aux moniteurs (Léo, Adrien, Pierre, Arnaud), vous déchirez et c'est grâce à vous que j'ai compris que ça se jouait dans la tête et qu'il ne fallait rien lâcher, même pour un petit pourcent de réussite en plus. J'ai découvert des gens incroyable et fous, n'est-ce pas les jumeaux (vous êtes des bros) ! En route vers la ceinture verte !

Enfin, merci Paris, ma ville de cœur et mon club de toujours. Nos superbes victoires autant que les (rares) défaites auront rythmé ces trois ans au point d'accrocher fièrement tes couleurs au labo.

Oh ville lumière, sens la chaleur de notre cœur, sens-tu notre ferveur quand nous marchons près de toi...

La thèse c'est répondre à une question scientifique en trois ans alors qu'on en aurait besoin de cinq mais, vous savez, moi je ne crois pas qu'il y ait de bonne ou de mauvaise situation. Moi, si je devais résumer ma vie aujourd'hui avec vous, je dirais que c'est d'abord des rencontres, des gens qui m'ont tendu la main, peut-être à un moment où je ne pouvais pas, j'étais seul chez moi. Et c'est assez curieux de se dire que les hasards, les rencontrent forgent une destinée... Parce que quand on a le goût de la chose, quand on a le goût de la chose bien faite, le beau geste, parfois on ne trouve pas l'interlocuteur en face, je dirais, le miroir qui vous aide à avancer. Alors ce n'est pas mon cas, comme je le disais là, puisque moi au contraire, j'ai pu ; et je dis merci à la vie, je lui dis merci, je chante la vie, je danse la vie... Je ne suis d'amour ! Et finalement, quand beaucoup de gens aujourd'hui me disent : « mais comment fais-tu pour avoir cette humanité ? » Eh bien je leur réponds très simplement que c'est ce goût de l'amour, ce goût donc qui m'a poussé aujourd'hui à entreprendre une construction mécanique, mais demain, qui sait peut-être simplement à me mettre au service de la communauté, à faire le don, le don de soi... » - Otis, Astérix et Obélix : Mission Cléopâtre.

Fluctuat Nec Mergitur

Table des matières

LISTE DES FIGURES.....	13
LISTE DES ABREVIATIONS	15
INTRODUCTION	19
1. LA MIGRATION	19
1.1. Importance de la migration neuronale	19
1.1.1. Rôle de la migration neuronale	19
1.1.2. Pathologies de migration neuronale	21
1.1.3. LIS1	22
1.1.4. DCX	23
1.2. La voie de migration depuis la ZSV vers le BO.....	23
1.2.1. Neurogénèse dans la zone sous-ventriculaire adulte	23
1.2.2. De la ZSV aux BOs : le courant de migration rostrale.....	24
1.2.3. Dans les BOs	25
1.2.4. Changements dans le CMR au cours du développement post-natal	26
1.2.5. CMR chez l’Homme	29
1.3. Autres exemples de neurones en migration	30
1.3.1. Les neurones corticaux embryonnaires	30
1.3.2. Les neurones du cervelet	31
1.4. Caractéristiques cellulaires des neurones en migration	33
1.4.1. Morphologie	33
1.4.2. La migration saltatoire	34
1.5. Mécanismes de contrôle de la migration neuronale	36
1.5.1. Facteurs chimiques.....	36
1.5.2. Facteurs d’adhésion	38
2. LE CIL PRIMAIRE.....	39
2.1. Historique	39
2.1.1. Nom et découverte du cil primaire	39
2.1.2. 1898, l’hypothèse Henneguy-Lenhossek.....	40
2.1.3. Microscopie électronique et redécouverte du cil primaire	40
2.1.4. L’âge d’or du cil primaire.....	41
2.2. Structure.....	41
2.2.1. Axonème.....	42
2.2.2. Zone de transition et adressage	43
2.2.3. Transport intraflagellaire.....	44
2.3. Ciliogénèse.....	44

2.4.	Transduction des signaux par le cil primaire	45
2.4.1.	Détection des molécules chimiques.....	45
2.4.2.	Détection des signaux mécaniques	45
2.5.	Rôle dans le neurodéveloppement	47
2.5.1.	Neurogénèse	48
2.5.2.	Migration neuronale.....	49
2.5.3.	Intégration.....	50
3.	L'ADENOSINE MONOPHOSPHATE CYCLIQUE (AMPc)	52
3.1.	Rôles de l'AMPc dans le développement du système nerveux.....	52
3.2.	Cycle de l'AMPc	52
3.2.1.	Synthèse et cibles	52
3.2.2.	Dégradation.....	53
3.3.	Compartmentation de l'AMPc.....	54
3.3.1.	Détection de l'AMPc par biosenseur FRET	54
3.3.2.	Quelques exemples de compartmentation subcellulaire de l'AMPc	55
3.3.3.	Mécanismes de compartmentation	56
	CONTEXTE.....	59
	MATÉRIEL ET MÉTHODES	63
	PARTIE I – Différences de comportement de migration entre les stades post-natal et jeune adulte.	
	Rôle différentiel du cil	71
	Discussion partie I.....	85
	PARTIE II – ARTICLE : Compartmentalized cAMP dynamics regulates neuronal migration	91
	DISCUSSION/CONCLUSION GENERALE.....	125
	BIBLIOGRAPHIE.....	133

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1 : Schéma des différentes voies de migration empruntées par les neurones au cours du développement du SNC.

Figure 2 : Modes de migration des neurones.

Figure 3 : Composition cellulaire de la zone ventriculaire-sous ventriculaire adulte.

Figure 4 : Courant de migration rostrale dans le cerveau de souris adulte.

Figure 5 : Développement des neurones granulaires du bulbe olfactif adulte.

Figure 6 : Le ventricule olfactif est présent à la naissance et se referme progressivement chez le rongeur.

Figure 7 : Modification des interactions entre les neuroblastes en migration dans le courant de migration rostrale.

Figure 8 : Schéma des changements morphologiques et moléculaires se déroulant durant l'évolution du CMR du stade périnatal au stade adulte en vue coronale.

Figure 9 : Courants de migration de jeunes neurones dans le lobe frontal de cerveau humain de nouveau-né.

Figure 10 : Voie de migration des interneurones dans le cortex.

Figure 11 : Migration neuronale durant le développement post-natal du cervelet.

Figure 12 : Schéma d'un neuroblaste en migration dans le CMR.

Figure 13 : Schéma de la migration saltatoire et des acteurs moléculaires impliqués.

Figure 14 : Le cil primaire est un petit organite présent à la surface de la plupart des cellules eucaryotes et joue le rôle d'antenne pour la cellule.

Figure 15 : La ciliogénèse est réalisée en 4 étapes distinctes.

Figure 16 : Tableau récapitulatif (non-exhaustif) des molécules dont les récepteurs sont présents au niveau du cil primaire.

Figure 17 : Schéma récapitulatif des caractéristiques du cil primaire au cours des différentes étapes de migration et de différenciation des neurones granulaires du BO adulte.

Figure 18 : La voie de signalisation AMPc est extrêmement complexe.

Figure 19 : Principe de fonctionnement du biosenseur EpacS^{H187}.

Figure 20 : Mécanismes de génération des domaines subcellulaires de l'AMPc.

Partie I – Différences de comportement de migration entre les stades post-natal et jeune adulte. Rôle différentiel du cil.

Figure 21 : Analyse en composante principale (ACP) à P60.

Figure 22 : Les neurones en migration dans le CMR possèdent des caractéristiques morphologiques différentes au cours du développement post-natal.

Figure 23 : Les paramètres de migration des neurones à P10 et P30 sont similaires.

Figure 24 : La directionnalité de migration des neurones est modifiée entre P10 et P30.

Figure 25 : L'ablation du cil primaire à P10 et P30 n'induit pas les mêmes défauts de migration et de nucléokinèse.

Figure 26 : L'ablation du cil primaire à P30 provoque un phénotype de directionnalité aggravé par rapport à P10.

Figure 27 : La voie Shh n'est pas activée dans les neurones du CMR à P10 et P60.

Partie II – ARTICLE : Compartmentalized cAMP dynamics regulates neuronal migration.

Figure 1: cAMP dynamics in migrating neurons of the mouse postnatal RMS.

Figure 2: Primary cilium ablation leads to disappearance of the cAMP hotspot.

Figure 3: Ciliary AC3 deletion leads to disappearance of the cAMP hotspot.

Figure 4: Migration defects after primary cilium ablation and AC3 knock-down.

Figure 5: Role of centrosomal PKA.

Figure 6: The cAMP hotspot is present in different kind of migrating neurons.

Figure sup. Rpgrip11: Migration defects after primary cilium ablation.

Discussion/Conclusion Générale

Figure 28 : Schéma récapitulant l'article

Figure 29 : Schéma de la migration nucléaire inter-kinétique des cellules de glie radiaire dans le neuroépithélium.

LISTE DES ABREVIATIONS

AC, Adenylate Cyclase

ACP, Analyse en Composante Principale

AKAP, A-Kinase Anchoring Protein

AMPc, Adénosine MonoPhosphate cyclique

ATP, Adénosine TriPhosphate

BDNF, Brain derived Neurotrophic Factor

BO, Bulbe Olfactif

CK, CentroKinèse

CNG, Cyclic Nucleotide Gated Channel

CMR, Courant de Migration Rostrale

CTR, Centrosome

DCC, Deleted in Colorectal Cancer

DCX, DoubleCortin

dnPKA, Dominant Negative Form of PKA

EGM, Eminences Ganglionnaires Médianes

EPAC, Exchange Protein activaté par l'AMPc

FRET, Förster Resonance Energy Transfer

GFAP, Glial Fibrillary Acidic Protein

GFP, Green Fluorescent Protein

GMPC, Guanosine MonoPhosphate cyclique

KD, Knock-Down

KIF, Kinesin IntraFlagellaire

KO, Knock-Out

LRR, Lèvres rhombiques Rostrales

MET, Microscopie Electronique à Transmission

MMPs, MétalloProtéases Matricielles

NCAM, Neural Cell Adhesion Molecule

NK, NucléoKinèse

ORPK, Oak Ridge Polycystic Kidney disease

PACAP, Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide

PDE, PhosphoDiEsterase

PKA, Protein Kinase A

RCPG, Récepteur Couplé à une Protéine G

Shh, Sonic Hedgehog

SNC, Système Nerveux Central

STIF, Système de Transport IntraFlagellaire

VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor

ZSV, Zone Sous-Ventriculaire

ZT, Zone de Transition

ZVC, Zone Ventriculaire Cérébelleuse

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1. LA MIGRATION

1.1. Importance de la migration neuronale

1.1.1. Rôle de la migration neuronale

Le système nerveux central des mammifères est constitué de régions qui possèdent chacune leur propre organisation et leur propre composition cellulaire. La migration neuronale est une étape-clé du développement et joue un rôle majeur dans la mise en place de l'architecture cérébrale et dans la composition de ces régions.

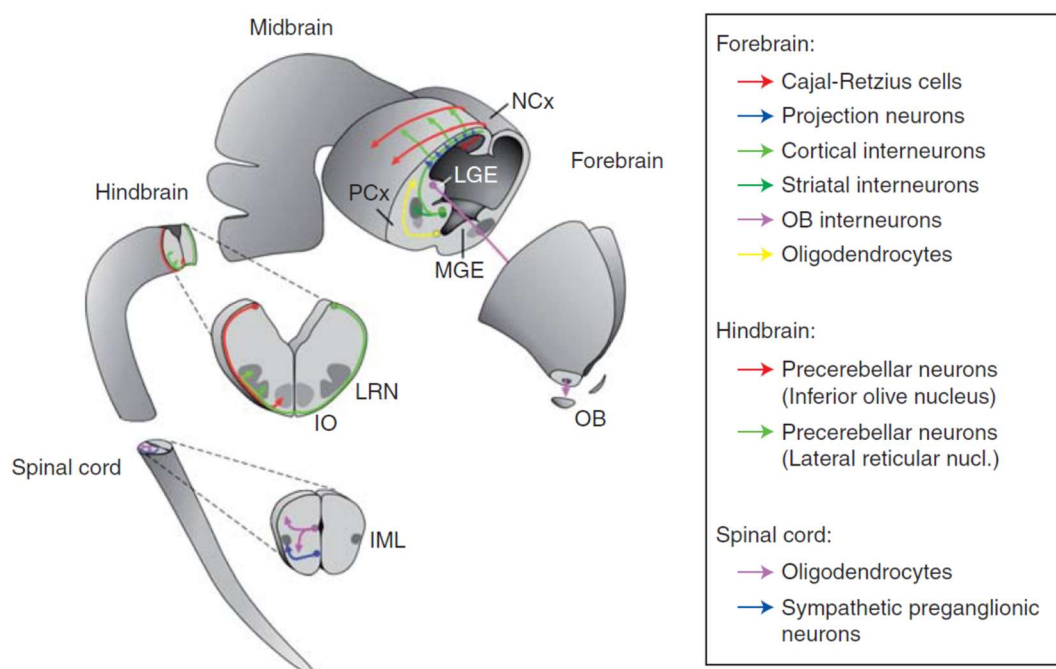


Figure 1 : Schéma des différentes voies de migration empruntées par les neurones au cours du développement du SNC.

Plusieurs voies de migration coexistent durant le développement embryonnaire dans différentes zones du système nerveux central. Abréviations : (IML) région intermédiolatérale de la moelle épinière, (IO) noyaux de l'olive inférieure, (LGE) éminences ganglionnaires latérales, (LRN) noyaux latéraux réticulés, (MGE) éminences ganglionnaires médianes, (NCx) néocortex, (OB) bulbes olfactifs. De Marín et al., 2010.

Les cellules progénitrices qui génèrent les neurones du système nerveux central sont réparties le long de l'axe antéro-postérieur du tube neural (Marín et al., 2010). Le développement des différentes structures cérébrales conduit à une augmentation progressive de leur volume et de la distance qui sépare les zones germinales des zones d'intégration. Les neurones se déplacent donc sur de longues distances, parfois jusqu'à plusieurs millimètres, pour trouver leur localisation finale. Dans le cerveau antérieur (Forebrain dans la figure 1) par

exemple, les neurones inhibiteurs du cortex sont générés par les éminences ganglionnaires médianes et migrent jusqu'au cortex (Figure 1, flèche vert clair). De même, les neurones des bulbes olfactifs sont générés dans le cerveau post-natal au niveau de la zone sous-ventriculaire (ZSV) du ventricule latéral et migrent sur une longue distance jusqu'au bulbe olfactif (BO) (Figure 1, flèche violette). Ce type de migration sur de longues distances existe également pour certains neurones du tronc cérébral ou de la moelle épinière (respectivement hindbrain et spinal cord sur la figure 1).

La migration permet par ailleurs de mélanger au sein de la même structure des neurones d'origine différente. Par exemple, les neurones excitateurs du cortex cérébral embryonnaire sont générés localement par les progéniteurs corticaux présents au niveau de la zone ventriculaire tandis que les neurones inhibiteurs sont produits à distance par les éminences ganglionnaires (Marín and Rubenstein, 2001). De même, les neurones du cervelet proviennent également de différentes régions progénitrices : les cellules de Purkinje GABAergiques sont produites dans la zone ventriculaire cérébelleuse alors que les cellules en grains glutamatergiques naissent au niveau des lèvres rhombiques (Rahimi-Balaei et al., 2018).

La migration des neurones est traditionnellement catégorisée en deux types : la migration radiaire et la migration tangentielle. La différence principale entre les deux types de migration réside dans l'axe de migration emprunté par rapport à la surface des ventricules du tube neural (Hatten, 1999; Marín and Rubenstein, 2003). Les neurones qui utilisent la migration radiaire suivent une trajectoire perpendiculaire à la surface des ventricules et parallèle à l'axe dorso-ventrale (Figure 2, gauche). Les neurones en migration tangentielle se déplacent parallèlement à la surface des ventricules et perpendiculairement aux fibres de glie radiaire (figure 2, droite). Certains types de neurones comme les neurones glutamatergiques corticaux par exemple utilisent uniquement la migration radiaire comme mode de migration (Martínez-Martínez et al., 2019). D'autres atteignent leur destination en utilisant la migration tangentielle suivie de la migration radiaire ou inversement au cours de leur trajet. Les neuroblastes issus de la ZSV migrent d'abord de manière tangentielle dans le courant de migration rostrale (CMR) puis, se réorientent et migrent de manière radiaire dans le bulbe olfactif (OB, Sun et al., 2010).

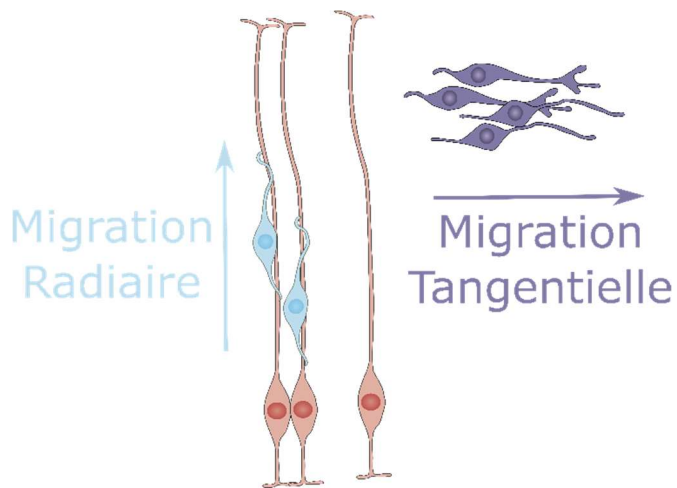


Figure 2 : Modes de migration des neurones

Les neurones en migration radiaire (bleu clair) migrent parallèlement aux prolongements de glie radiaire (rouge). Les neurones en migration tangentielle (violet) migrent perpendiculairement aux prolongement de glie radiaire.

1.1.2. Pathologies de migration neuronale

La migration neuronale est une étape critique du développement du système nerveux central. La compréhension de ce processus a progressé grâce aux études de pathologie de migration neuronale chez l'Homme en particulier la lisencéphalie ainsi que des modèles de souris mutantes lui correspondant (Kato and Dobyns, 2003).

La lisencéphalie est principalement caractérisée par une surface presque ou entièrement lisse du cerveau. Elle comprend en fait une large variété de malformations corticales allant de la réduction du nombre de circonvolutions localement (pachygyrie) à l'absence complète de circonvolutions (agyrie). La lisencéphalie peut également être associée à la présence de bandes sous-corticales hétérotopiques (hétérotopie sous-corticale en bande) qui sont des bandes ectopiques de neurones présentes juste sous le cortex et séparées de celui-ci par une fine couche de matière blanche (Barkovich et al., 1996).

Les lisencéphalies se catégorisent en plusieurs types, basé sur l'étude des cerveaux des patients atteints de cette pathologie (Barkovich et al., 1996). La plus commune est la lisencéphalie de type I ou lisencéphalie classique. Elle est caractérisée par une augmentation de l'épaisseur du cortex et la réduction du nombre de couches corticales distinguables de six à quatre. La lisencéphalie de type II ou lisencéphalie pavimenteuse est caractérisée par l'absence totale de couches corticales distinctes. La surface cérébrale est bosselée ou granuleuse et les circonvolutions sont plus ou moins effacés. Les ventricules cérébraux sont également dilatés et d'autres organes comme les yeux ou les muscles sont atteints (Kurlemann et al., 1993).

A ce jour, cinq gènes ont été identifiés comme cause ou contribuant au développement de ces pathologies chez l'Homme : LIS1, DCX, RELN, ARX et 14-3-3ε (Kato and Dobyns, 2003). LIS1 (lissencephaly-1) et DCX (Doublecortine lié à l'X) sont les gènes les plus couramment touchés.

Les défauts de migration neuronale sont également responsables de nombreux cas de retards mentaux et d'épilepsies chez les enfants (Dobyns et al., 1996; Farrell et al., 1992) et pourraient aussi participer à des pathologies comme la schizophrénie et certains troubles du spectre autistique (Reiner and Sapir, 2009).

1.1.3. LIS1

La majorité des cas de lisencéphalies est associée à une mutation ou une délétion dans le gène LIS1/PAFAH1B1 (Mei et al., 2008). Il code pour la protéine Lis1 qui fonctionne comme une sous-unité régulatrice de la platelet-activating factor acetylhydrolase (Hirotune et al., 1998). Lis1 est exprimée de manière prédominante dans le cerveau au stade fœtal et adulte (Mizuguchi et al., 1995). Lis1 s'associe avec les microtubules pour promouvoir leur stabilisation *in vitro* (Sapir et al., 1997).

Plusieurs études lient de manière évidente Lis1 et la régulation de la migration neuronale dans le cerveau en développement. Des défauts de migration radiaire ont été observés dans de multiples modèles de souris : modèle hypomorphe Lis1/Lis1 (Cahana et al., 2001), des souris Lis1^{-/+} (Hirotune et al., 1998), des souris Lis1^{lox/lox} (Hirotune et al., 1998) ou par KD du gène en utilisant l'électroporation *in utero* (Tsai et al., 2007). Dans les neurones avec un niveau d'expression de Lis1 réduit, les mouvements du centrosome et du noyau sont moins couplés (Shu et al., 2004; Tanaka et al., 2004). L'utilisation d'un shRNA Lis1 inhibe la translocation nucléaire sans affecter l'extension du prolongement de migration (Tsai et al., 2007). Dans les cellules en grain du cervelet en migration tangentielle, l'inhibition de Lis1 induit le blocage de la migration nucléaire sans affecter le couplage du centrosome et des microtubules dans le prolongement de migration (Umeshima et al., 2007). La mutation de Lis1 affecte également la migration tangentielle des interneurones GABAergiques du cortex (McManus et al., 2004).

1.1.4. DCX

Des mutations dans le gène DCX conduit à la lisencéphalie chez l'homme et l'hétérotopie subcorticale chez la femme (des Portes et al., 1998).

Le gène DCX code pour la Doublecortin (Dcx) qui est une protéine associée aux microtubules (Francis et al., 1999). Elle est exprimée dans les neurones en migration (Gleeson et al., 1998). Dcx promeut la nucléation, l'assemblage et la stabilisation des microtubules (Moores et al., 2004). La protéine interagit également avec Lis1 pour permettre la polymérisation des microtubules de manière efficace (Caspi et al., 2000). Dcx est aussi impliqué dans la régulation du cytosquelette d'actine de manière directe ou indirecte (Tsukada et al., 2005, 2006).

Dans les souris KO pour Dcx, la lamination des couches corticales est correcte alors que des défauts sévères de lamination sont observés dans l'hippocampe (Corbo et al., 2002). Le KD de Dcx par électroporation *in utero* chez la souris et le rat a un phénotype plus sévère puisqu'il inhibe la migration des neurones corticaux excitateurs (Kriegstein and Noctor, 2004). Le KO de DCX a un effet plus important encore dans la migration des interneurons entraînant des problèmes de nucléokinese et de branchement (Kappeler et al., 2006). Dcx joue également un rôle important dans la migration des neurones en migration vers le bulbe olfactif de la souris adulte puisque son KD diminue la migration des cellules provenant de la ZSV (Ocbina et al., 2006).

L'interaction entre Dcx et les microtubules est régulée en partie par la phosphorylation par au moins 4 kinases différentes : JNK (Gdalyahu et al., 2004), Cdk5 (Tanaka et al., 2004), la protéine kinase A (PKA, (Schaar et al., 2004)) et GSK3 β (Bilimoria et al., 2010). Les études *in vitro* indiquent que les phosphorylations de Dcx par Cdk5 et PKA réduisent l'affinité de la protéine pour les microtubules (Schaar et al., 2004; Tanaka et al., 2004).

1.2. La voie de migration depuis la ZSV vers le BO

1.2.1. Neurogénèse dans la zone sous-ventriculaire adulte

La ZSV est la niche neurogénique la plus importante du cerveau des mammifères adulte. Dans cette niche (Figure 3), les cellules souches neurales (Type B) qui ressemblent à des astrocytes, prolifèrent lentement et produisent des progéniteurs (Type C) qui se divisent

activement. Ces cellules génèrent de manière très rapide des neuroblastes (Type A) qui migrent jusqu'aux BO (Doetsch, 2003; Doetsch et al., 1999; Ihrie and Álvarez-Buylla, 2011). La maturation des neuroblastes de la ZSV jusqu'au BO est très stéréotypée avec des étapes de distinctes correspondant à des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles bien définies.

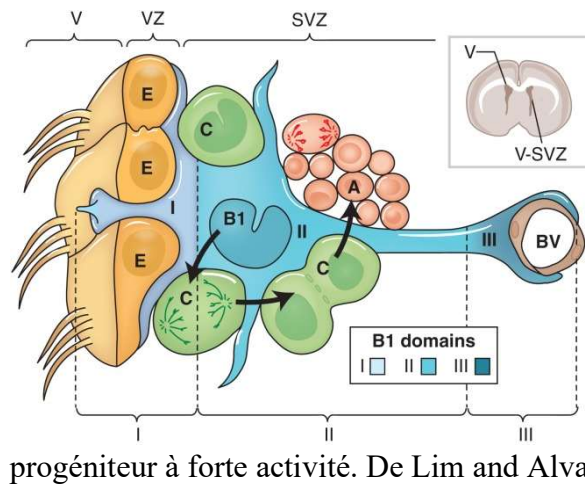


Figure 3 : Composition cellulaire de la zone ventriculaire-sous ventriculaire adulte.

Section coronale d'un cerveau de souris adulte dans le coin droit. Les cellules de type B génèrent les cellules de type C qui produiront les cellules de type A. Abréviations : (A) cellule de type A ou neuroblaste, (B1) cellule de type B1 ou cellule souche neurale, (BV) vaisseau sanguin, (C) cellule de type C ou progéniteur à forte activité. De Lim and Alvarez-Buylla, 2016.

1.2.2. De la ZSV aux BOs : le courant de migration rostrale

Après avoir été générées dans la ZSV, les cellules de type A migrent sur une distance considérable (jusqu'à plusieurs millimètres) à travers une voie de migration, le CMR (Figure 4A). Ce courant s'étend de la ZSV jusqu'à l'entrée des BOs.

A

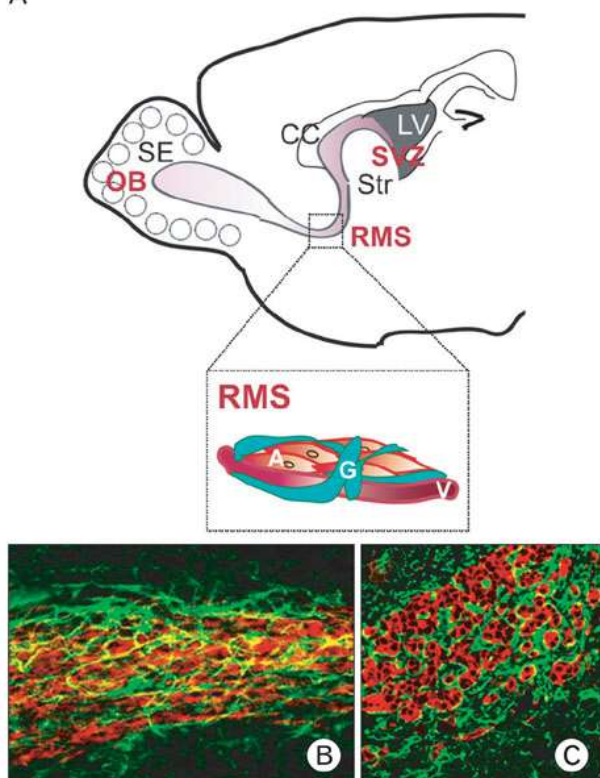


Figure 4 : Courant de migration rostrale dans le cerveau de souris adulte.

(A) Les neuroblastes migrent jusque dans les bulbes olfactifs à travers le courant de migration rostrale. Dans le courant, les cellules en migration forment des chaînes et sont entourées de tubes gliaux. A l'intérieur du CMR, des vaisseaux sanguins apportent un support de migration supplémentaire. (B, C) Double immunomarquage des neurones en migration (DCX en rouge) et des tubes gliaux (GFAP en vert) dans le CMR. (B) Coupe sagittale. (C) Coupe coronale. Abréviations : (A) neuroblaste de type A, (CC) corps calleux, (G) tube glial, (LV) ventricule latérale, (Str) striatum, (V) vaisseau sanguin. Adapté de Sun et al., 2010.

Dans le courant, les jeunes neurones se déplacent collectivement de manière tangentielle. La morphologie de ces cellules en migration est décrite dans le paragraphe 1.4.1. Les neuroblastes forment des interactions homotypiques neuroblaste-neuroblaste et forment chaînes de neurones en migration (Figure 4B, C, Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002; Lois et al., 1996). Ces chaînes sont entourées de prolongement astrocytaires qui isolent les jeunes neurones de l'environnement adulte extérieur.

1.2.3. Dans les BOs

Une fois arrivés dans le bulbe olfactif, les neuroblastes se détachent les uns des autres, se réorientent et migrent de manière radiaire dans la couche granulaire avant de s'immobiliser pour entamer leur différenciation et leur intégration dans le réseau préexistant. Une classification des jeunes neurones aux différentes étapes de leur migration et intégration a été établie dans Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002 (Figure 5).

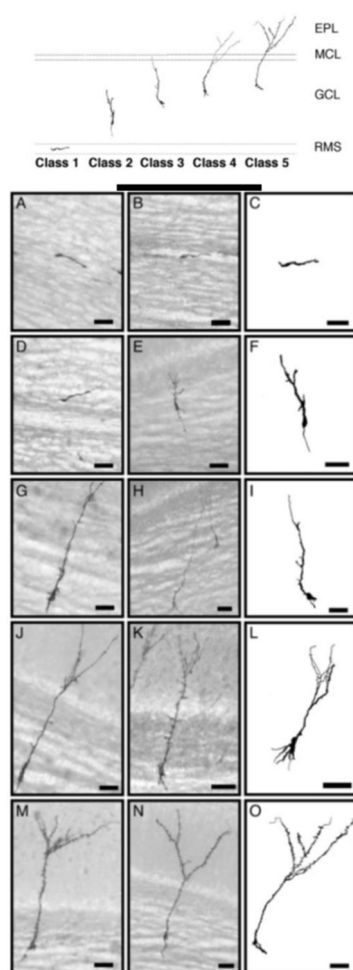


Figure 5 : Développement des neurones granulaires du bulbe olfactif adulte.

En haut, classification des différents stades de maturation des neurones granulaires du bulbe olfactif adulte. En bas, Coloration Alcaline phosphatase des différentes classes de neurones en migration dans le bulbe olfactif adulte.

Microphotographie (colonne de gauche et au centre) et dessins en camera lucida (colonne de droite). (A-C): Type 1. (D-F): Type 2. (G-I): Type 3. (J-L): Type 4. (M-O): Type 5. (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002).

Les jeunes neurones en migration tangentielle dans le CMR sont appelés Type 1 (Figure 5 A-C). Les Type 2 sont des cellules qui migrent de manière radiaire dans la couche granulaire (Figure 5 D-F). Elles maintiennent une morphologie allongée mais leur prolongement de migration et leur prolongement de queue sont plus longs que les Type 1. Le prolongement de migration est fréquemment branché et leur cône de croissance est moins visible que dans les cellules de Type 1.

Les cellules qui ont terminé leur migration radiaire et qui débutent leur différenciation sont appelées Type 3 (Figure 5 G-

I). Leur morphologie change drastiquement : elles n'ont plus de prolongement de migration, leur corps cellulaire est plus large et arrondi et n'a plus de contour lisse. Les dendrites basales et les dendrites apicales commencent à se développer.

Les cellules de Type 4 continuent leur différenciation (Figure 5 J-L). Leur dendrite apicale a franchi la couche des cellules mitrales. Elle est branchée mais ne porte pas encore d'épines.

Les cellules de Type 5 sont complètement différenciées (Figure 5 M-O). Elles présentent des épines sur leur longue et branchée dendrite apicale.

1.2.4. Changements dans le CMR au cours du développement post-natal

Le courant de migration existe déjà au stade post-natal (Luskin, 1998) et est conservé à l'âge adulte (Rousselot and Nottebohm, 1995). La migration dans le CMR post-natal est souvent considérée comme un modèle général de la migration dans le CMR adulte comme par exemple dans (Hanics et al., 2017; Ota et al., 2014). Néanmoins, certaines études suggèrent que les migrations diffèrent entre post-natal et adulte et en particulier que l'environnement de migration évolue (David et al., 2013; Fasolo et al., 2002; Peretto et al., 2005).

La première différence morphologique importante concerne le ventricule olfactif. Au stade périnatal précoce, les ventricules latéraux possèdent une extension rostrale appelée ventricule olfactif, qui longe le CMR jusqu'à la base du BO. Il se referme progressivement à partir du troisième jour après la naissance (Figure 6, OV, Peretto et al., 2005). Par ailleurs, une modification majeure est le changement de largeur du CMR (Aoyagi et al., 2018) probablement consécutive à la diminution du rythme de neurogénèse de la ZSV.

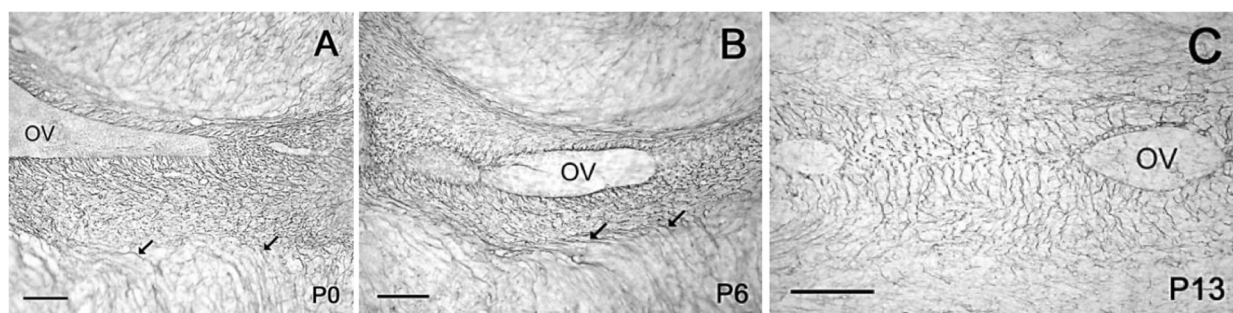


Figure 6 : Le ventricule olfactif est présent à la naissance et se referme progressivement chez le rongeur.

Immunomarquage anti-vimentine sur coupe sagittale ultrafine de CMR de rat. Abréviations : OV : ventricule olfactif. De Peretto et al., 2005.

Un autre changement majeur concerne les interactions entre cellules en migration dans le CMR (Peretto et al., 2005). Durant la première semaine après la naissance, les neuroblastes

dans le CMR forment une masse uniforme de cellules en migration qui remplit complètement le courant. Les images de microscopie électronique obtenues à P6 sur des coupes de cerveau de souris montrent que les neuroblastes établissent des contacts homotypiques très étroits les uns avec les autres (Figure 7A et C). Les neurones adjacents aux vaisseaux sanguins sont en contact direct avec les cellules endothéliales de ceux-ci (Figure 7A, bv). Autours de P21-P25, cette organisation cellulaire change drastiquement. Les jeunes neurones sont organisés sous forme de chaînes de neurones de quelques corps cellulaires de diamètre seulement. Entre les cellules, on note la présence de larges espaces intercellulaires.

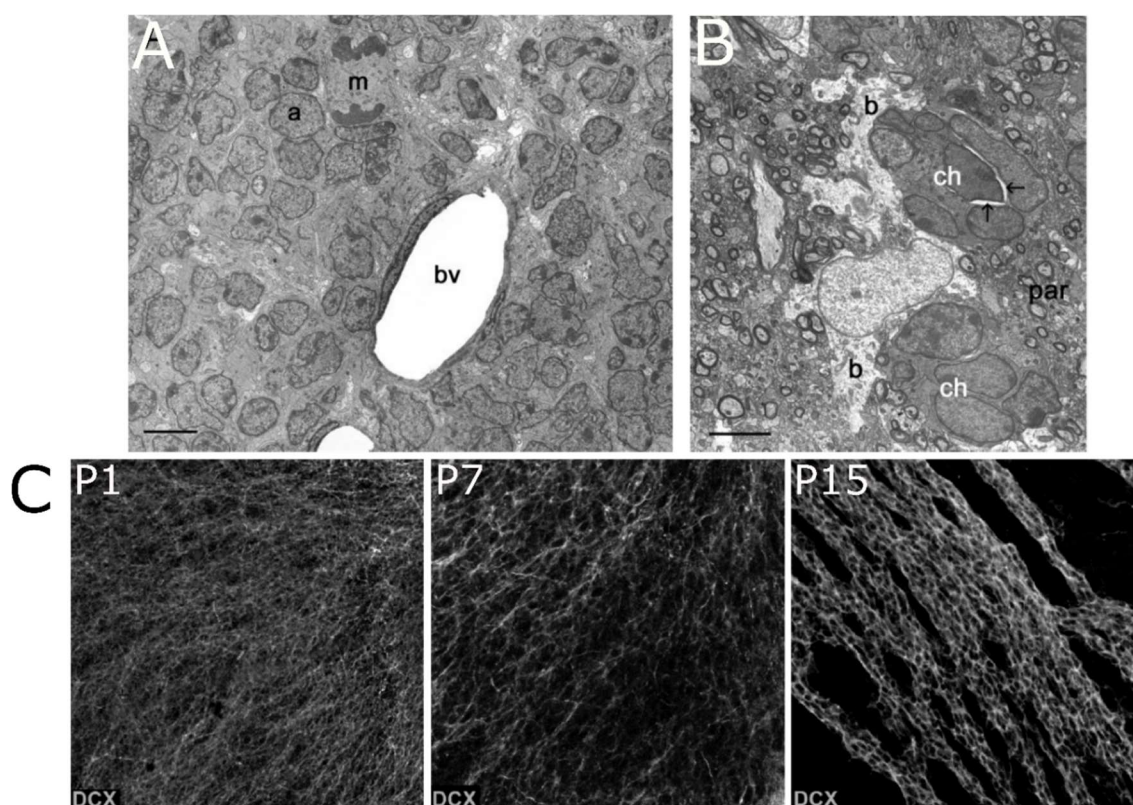


Figure 7 : Modification des interactions entre les neuroblastes en migration dans le courant de migration rostrale

(A-B) Etude en microscopie électronique de l'ultrastructure du CMR au stade post-natal précoce (A) et à P21 (B). **(A)** Faible grossissement du CMR montrant une masse homogène de cellules de type A (a) dont certaines sont en contact direct avec les vaisseaux sanguins (bv). **(B)** A P21, les chaînes de neuroblastes (ch) sont entourées de prolongements astrocytaires (b). Des espaces intracellulaires apparaissent autour des cellules (flèches). De Peretto et al., 2005. **(C)** Préparation en « whole-mount » de ventricule de souris à P1 (gauche), P7 (centre) et P15 (droite) montrant l'apparition progressive des chaînes de neurones en migration avec un marquage immunohistochimique contre DCX. De García-González et al., 2016.

A ce stade, les neurones en migration à proximité des vaisseaux sanguins ne sont plus en contact direct avec ceux-ci à cause de la présence de prolongement de glie entre les neurones et les vaisseaux sanguins (Figure 7B et C). Parallèlement à l'apparition des chaînes de cellules en migration, les cellules gliales du CMR opèrent également des changements morphologiques. Juste après la naissance de l'individu, les cellules de glie radiaire se transforment en astrocytes. Leurs prolongements, qui s'étendaient partout dans le tissu (flèches, figure 6A, B), se réorientent pour devenir parallèles aux chaînes de neurones en formation et les entourer à partir de la troisième semaine de vie post-natale (Figure 8, Peretto et al., 2005).

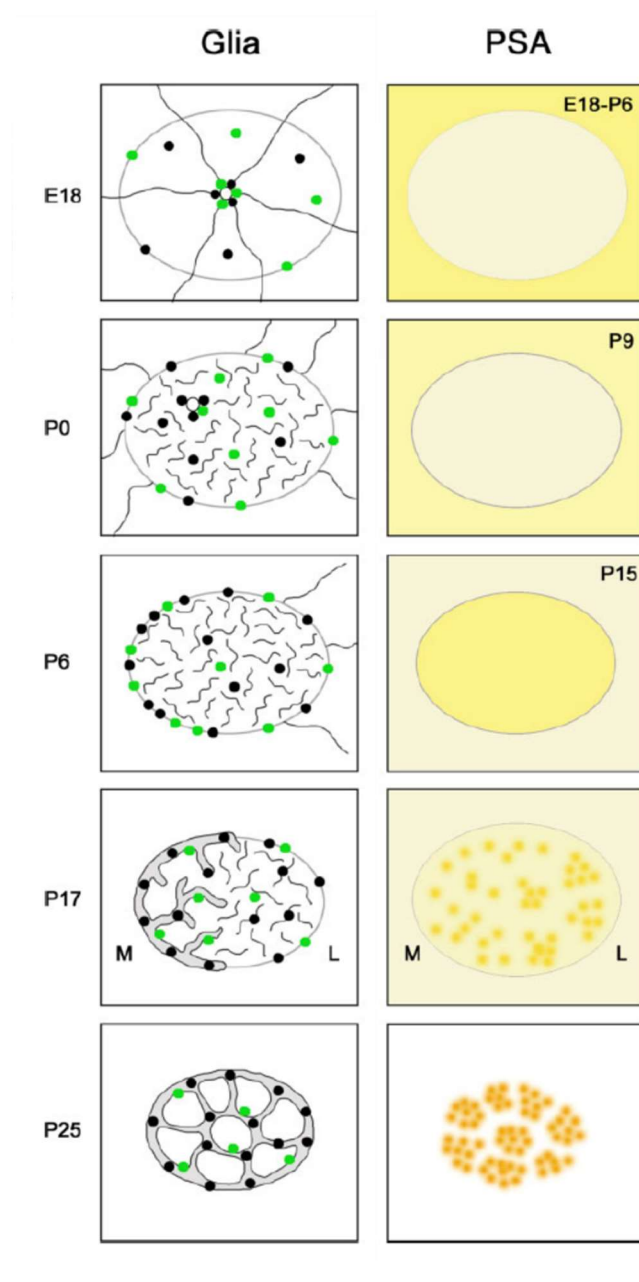


Figure 8 : Schéma des changements morphologiques et moléculaires du stade périnatal au stade adulte en vue coronale.

Au cours du développement post-natal, le réseau glial se développe avec la prolifération du nombre de cellules (points noirs) et la réorientation des prolongements radiaux long (traits longs) en prolongements courts et plus nombreux au sein du CMR (traits courts). L'organisation progressive des prolongements gliaux semble être associée à la compartimentation des neurones en migration dans les chaînes (blanc et jaune). De Peretto et al., 2005.

1.2.5. CMR chez l'Homme

Durant les 30 dernières années, il a y eu une forte augmentation du nombre d'études sur la neurogénèse adulte dans différents modèles animaux. La motivation principale de ce genre d'étude était que des processus similaires pouvaient exister chez l'Homme et que des altérations de cette neurogénèse pouvait être à l'origine de pathologies. De plus, la stimulation de la neurogénèse adulte pouvait être une formidable thérapie pour un certain nombre de pathologies neurologiques. La difficulté d'obtention de tissus en bon état et l'absence de techniques spécifiques pour l'étude chez l'Homme a contribué à entretenir le flou autour de cette question et de sa potentielle persistance chez l'Homme, occasionnant un intense débat.

Arturo Alvarez-Buylla et ses collègues ont étudié l'architecture cellulaire de la ZSV chez l'Homme, sur une centaine de cerveaux (Sanai et al., 2004). L'architecture de la ZSV chez l'Homme est différente de celle décrite chez la souris (voir paragraphe 1.2.1). Ils ont observé une bande de cellules astrocytaires GFAP positives parallèle à la couche de cellules épendymaires.

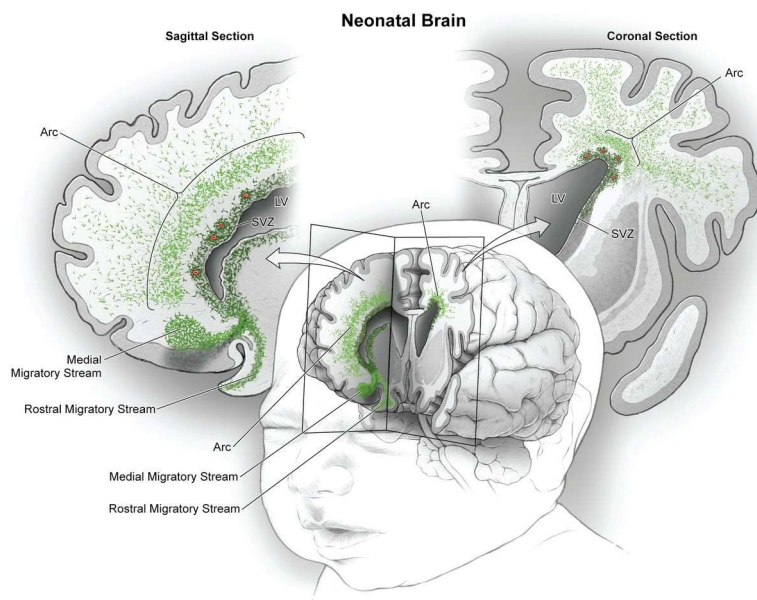


Figure 9 : Courants de migration de jeunes neurones dans le lobe frontal de cerveau humain de nouveau-né.

Vue en coupe sagittale à gauche et coronale à droite de neurones en migrations (points verts). (Paredes et al., 2016).

La production de nouveaux neurones dans le cerveau humain diminue considérablement durant les six premiers mois de vie (Sanai et al., 2004). La présence du courant de migration rostrale chez l'Homme reste controversé (Bergmann et al., 2015; Curtis et al., 2007; Sanai et al., 2007). Une étude de Curtis et ses collègues (Curtis et al., 2007) suggéraient par utilisation de marquage immunohistochimiques la présence de neuroblastes en prolifération et migration au sein d'un CMR particulièrement large avec un ventricule

s'étendant jusqu'au BO. Cependant, par la suite, des travaux convaincants menés par Arturo Alvarez-Buylla suggèrent fortement que le CMR disparaît au cours du développement post-natal et par ailleurs que d'autres voies de migration spécifiques à l'homme existeraient depuis la ZSV vers le cortex chez le nouveau-né (Figure 9, Paredes et al., 2016; Sanai et al., 2011). Le débat sur la neurogénèse adulte chez l'humain reste en tout cas vif à l'heure actuelle mais particulièrement en ce qui concerne son existence dans l'hippocampe humain (Paredes et al., 2018; Tartt et al., 2018).

1.3. Autres exemples de neurones en migration

1.3.1. Les neurones corticaux embryonnaires

Le cortex est principalement constitué de deux types de neurones, les neurones glutamatergiques et les interneurones GABAergiques et l'équilibre dans la composition de ces deux sous-populations est indispensable à son bon fonctionnement.

Les neurones corticaux excitateurs sont produits à partir d'un épithélium prolifératif composé de cellules de glie radiaire bordant les ventricules. Peu après leur naissance, les neurones post-mitotiques migrent de manière radiaire le long des prolongements de glie radiaire depuis la zone ventriculaire vers la surface du cortex en développement. Durant leur migration, ces neurones adoptent d'abord une morphologie multipolaire dans la zone intermédiaire et la zone sous-ventriculaire, changeant régulièrement de direction de migration avant de migrer de manière radiaire vers la surface du cortex (Tabata and Nakajima, 2003). Les neurones s'ajoutent successivement dans un mode dit « *Inside-out layering* » ou d'ajout de l'intérieur vers l'extérieur permettant ainsi la mise en place des différentes couches du néocortex. L'addition de ces cellules durant cette période d'expansion de la plaque corticale résulte en une augmentation progressive de l'épaisseur du cortex.

Parallèlement, les interneurones inhibiteurs sont générés en dehors du cortex, au niveau des éminences ganglionnaires médianes (EGM) du télencéphale basal (Figure 10, EGM). Les interneurones corticaux migrent sans interactions homotypiques vers la frontière qui sépare le cerveau ventral du cortex.

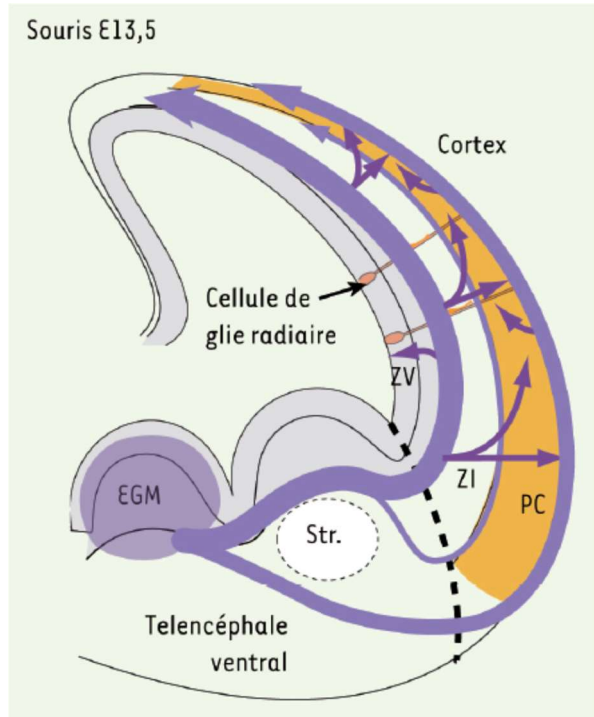


Figure 10 : Voie de migration des interneurones dans le cortex.

Les interneurones sont générés par les éminences ganglionnaires médianes. Ils migrent à travers deux courants de migration qui sont répartis autour de la plaque corticale. Ils se réorientent ensuite et migrent de manière radiale pour coloniser la plaque corticale. Abréviations : (EGM) éminences ganglionnaires médianes, (PC) plaque corticale, (Str) Striatum, (ZI) zone intermédiaire, (ZV) zone ventriculaire. (Métin, 2014).

Après avoir traversé cette frontière, les neurones se distribuent de part et d'autre de la plaque corticale et s'organisent en deux flux parallèles. Un flux occupe la zone marginale au-dessus de la plaque corticale tandis que le second s'établit le long de la zone proliférative (Figure 10, flèches violettes). Les neurones quittent par la suite ces flux tangentiels en se réorientant et migrent de manière radiale pour coloniser la plaque corticale en développement (Baudoin et al., 2012; Marín and Rubenstein, 2001).

1.3.2. Les neurones du cervelet

Les neurones du cervelet dérivent de deux zones germinales distinctes : la zone ventriculaire cérébelleuse (ZVC) et les lèvres rhombiques rostrales (LRR). La zone ventriculaire cérébelleuse génère les cellules de Purkinje, les cellules de Golgi, les cellules en étoile et les cellules en corbeille (Butts et al., 2014). Les cellules en grain et les neurones des noyaux cérébelleux sont produites par les lèvres rhombiques (Rahimi-Balaei et al., 2018). Les séquences de migration de ces cellules sont extrêmement compliquées et chaque type cellulaire migre de manière différente (Figure 11, Rahimi-Balaei et al., 2018).

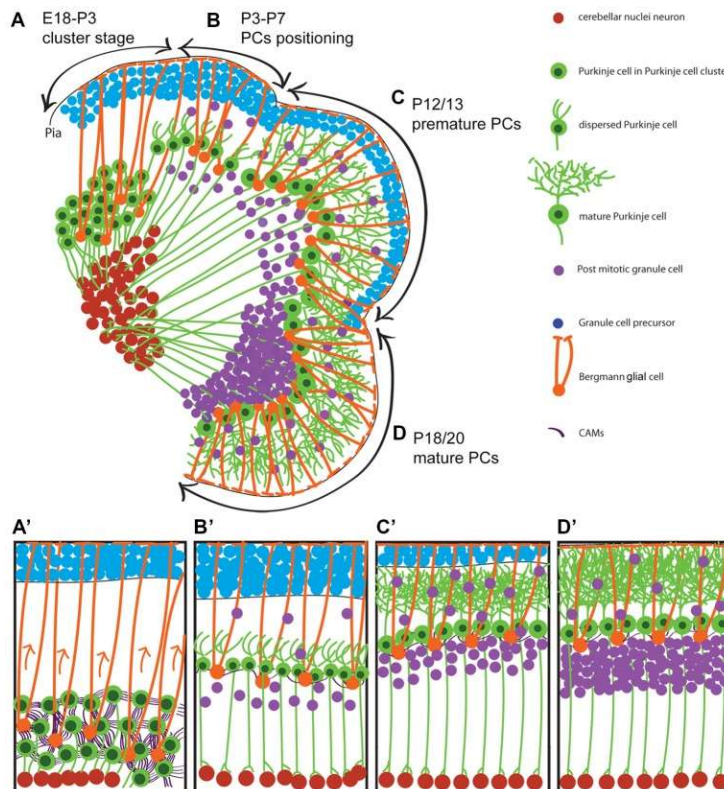


Figure 11 : Migration neuronale durant le développement post-natal du cervelet.

Illustration schématique du développement cérébelleux sur une coupe sagittale de cervelet de souris post-natal. Les cellules de Purkinje (vert), les cellules en grain (violet) et les neurones des noyaux cerebelleux (rouge) sont représentés au court des différents stades de développement. (Rahimi-Balaei et al., 2018).

Une fois que les cellules de Purkinje sont post-mitotiques, elles migrent de manière radiaire sur une courte distance le long des prolongements de la glie radiaire depuis la ZVC pour former une multicouche irrégulière appelée la plaque cérébelleuse (Cellules vertes de la figure 10, Miyata et al., 2010). Un peu plus tard durant le développement, les cellules migrent de manière tangentielle pour former une monocouche, la couche des cellules de Purkinje (Yuasa et al., 1996).

Les interneurones GABAergiques (Cellules en étoile et en panier) migrent depuis la ZVC jusqu'à la matière blanche en continuant à se diviser sur le trajet (Wefers et al., 2018). Puis ils migrent de manière radiaire vers la couche moléculaire où ils s'accumulent au niveau de la bordure interne de la couche granulaire externe. Ils migrent ensuite de manière tangentielle pour s'installer de manière définitive dans la couche moléculaire.

Les cellules granulaires (cellules violettes dans la figure 11) migrent d'abord de manière tangentielle pour atteindre la zone germinale externe où ils prolifèrent. Une fois cette étape réalisée, les cellules changent de direction de migration et migrent de manière radiaire le long des prolongements de la glie de Bergmann en traversant la couche des cellules de Purkinje en développement pour former la couche granulaire du cortex cérébelleux. Cette migration est particulière puisque les cellules migrent de l'extérieur vers l'intérieur de l'organe (Leto et al., 2016).

Les neurones des noyaux cérébelleux (cellules rouges dans la figure 11) migrent de manière tangentielle à partir des LRR à travers un courant de migration rostrale jusqu'au milieu du primordium cérébelleux puis change de direction de migration vers la zone transitoire nucléaire pour former une masse de cellules qui sera ensuite répartie et organisée pour former les noyaux cérébelleux médians, latéraux et interposés (Fink et al., 2006).

1.4. Caractéristiques cellulaires des neurones en migration

1.4.1. Morphologie

Les cellules en migration du CMR ont une morphologie bipolaire similaire à celle de nombreux autres neurones en migration (Kishi, 1987; Lois et al., 1996; Wichterle et al., 1997). La polarité de la cellule est déterminée par la position du centrosome par rapport au corps cellulaire. Il est le centre organisateur des microtubules (Figure 12, CTR) (Spiegelman et al., 1979). Il coordonne le réseau de microtubules qui forme le cytosquelette de la cellule et la cage périnucléaire entourant le noyau (Rivas and Hatten, 1995; Xie et al., 2003). A l'arrière de la cellule on retrouve le *corps cellulaire*, ovale, qui contient le noyau. On peut observer de temps en temps un *prolongement de queue* ou « trailing process ». Il est le reflet de la position du corps cellulaire durant le précédent cycle de migration saltatoire. Ce compartiment subcellulaire est également riche en actine et en myosine dont l'action synergique est importante pour la génération des forces de poussée pendant la nucléokinèse.

A l'avant du noyau, le centrosome se déplace dans le *prolongement de migration* au cours des différentes étapes de la migration saltatoire. Le prolongement de migration s'étend dans la direction de migration. Il s'agit de la partie la plus dynamique de la cellule puisqu'il s'allonge et se rétracte au cours de la migration. Il se plie également en réponse à des molécules de guidage attractives ou répulsives (détaillé dans le paragraphe suivant).

Le prolongement de migration se termine par une structure similaire aux cônes de croissances des axones en migration que l'on appelle également *cône de croissance*. Il est composé majoritairement d'actine et de microtubules et est extrêmement dynamique durant la migration.

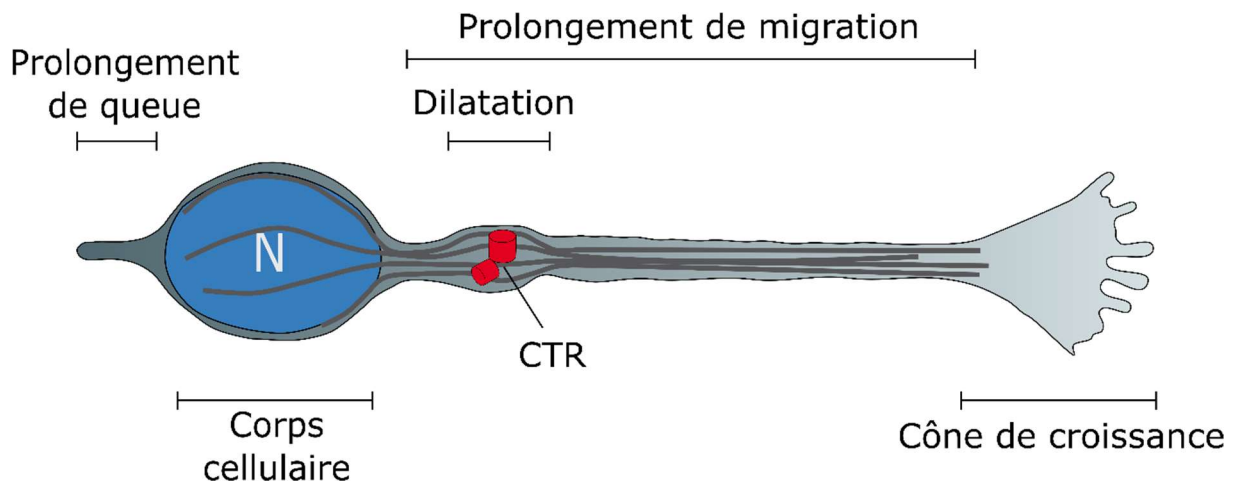


Figure 12 : Schéma d'un neuroblaste en migration dans le CMR

Les cellules en migration dans le CMR sont bipolaires. Le corps cellulaire est situé à une extrémité de la cellule. Le centrosome coordonne le cytosquelette de microtubules de la cellule (traits gris). Le prolongement de migration se termine par un cône de croissance. Abréviations : (CTR) centrosome, (N) noyaux.

1.4.2. La migration saltatoire

Tous les neurones utilisent la migration saltatoire comme méthode de locomotion. C'est un processus en trois étapes qui implique (i) l'extension du prolongement de migration, (ii) la formation de la dilatation et la migration du centrosome et (iii) la translocation du soma (Figure 4, Wichterle et al 1997 ; Bellion et al 2005 ; Schaar et McConnell 2005 ; Baudoin et al. 2012).

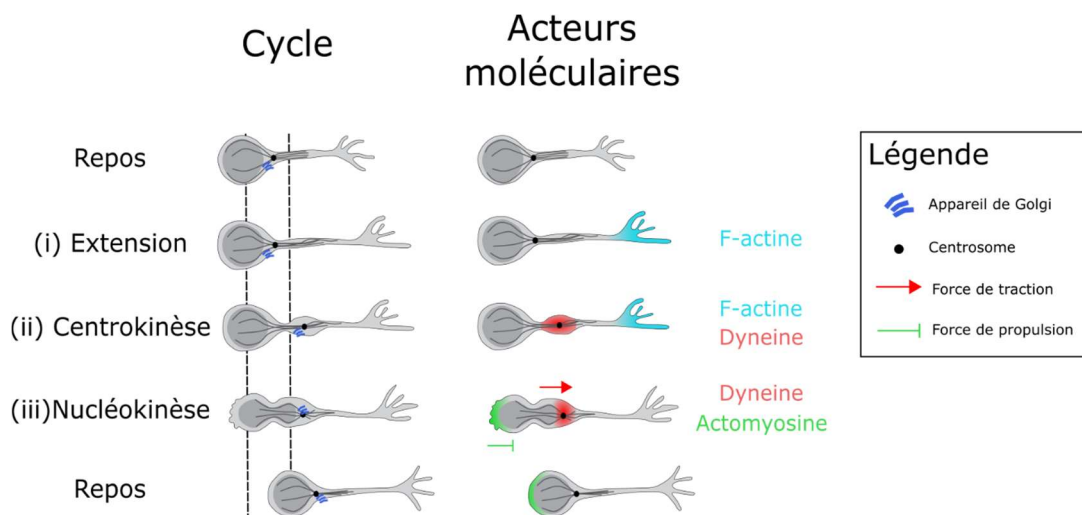


Figure 13 : Schéma de la migration saltatoire et des acteurs moléculaires impliqués

(Gauche) Le neurone suit un schéma classique en trois étapes avec l'extension du prolongement de migration puis la centrokinese qui précède la nucléokinese. (Droite) Le cytosquelette et les moteurs moléculaires sont des acteurs majeurs de la migration saltatoire.

- (i) La direction du prolongement de migration détermine la direction de migration (Martini et al., 2009). Dans les neuroblastes issus de la zone ventriculaire/sous-ventriculaire, des filaments de F-actine s'accumulent au bout du prolongement de migration durant son extension. Cette accumulation est régulée par des petites GTPases appartenant à la famille Rho comme Rac1. Le traitement pharmacologique de neuroblastes en migration avec du Nocodazole empêche l'extension du prolongement de migration (Schaar and McConnell, 2005). D'autres études ont montré que la mutation dans le gène cyclin-dépendant kinase 5 (Cdk5) ou doublecortin (Dcx), tous deux impliqués dans l'organisation des microtubules, induit des défauts morphologiques du prolongement de migration des neurones, plus courts et plus branchés (Hirota et al., 2007; Koizumi et al., 2006). Ceci suggère que les microtubules sont aussi impliqués dans cette étape.

- (ii) La dilatation est un gonflement cytosolique qui se forme de manière transitoire dans la partie proximale du prolongement de migration. La création de ce renflement se déroule après l'extension du prolongement de migration et avant la translocation nucléaire. Elle contient des organites intracellulaires comme le centrosome et l'appareil de Golgi (Bellion et al., 2005).
RhoA, une petite GTPase dont la fonction est associée à la régulation du cytosquelette et de la contractilité de l'actomyosine, est activé dans la dilatation ou dans la partie proximale du prolongement de migration, en fonction de la phase de migration (Ota et al., 2014). Gmip, une protéine activée par RhoA est également présente. Elle inhibe l'activité de RhoA et diminue la fréquence de formation de la dilatation (Ota et al., 2014). mDia, un effecteur de RhoA, est requis pour la migration du centrosome dans la dilatation sans pour autant affecter sa formation (Shinohara et al., 2012). L'ensemble de ces protéines fonctionne ensemble pour la réalisation de l'étape de formation de la dilatation et de la migration du centrosome vers l'avant de la cellule.

- (iii) La translocation nucléaire est déterminée par la dynamique du système actomyosine, régulée par RhoA. Durant la translocation du soma, l'accumulation de non-muscle-myosine-II et de F-actine est observée au niveau

de la partie proximal du prolongement de migration et à l'arrière de la cellule dans le prolongement de queue (Martini and Valdeolmillos, 2010). La perturbation de RhoA ou de la myosine-II par traitement pharmacologique induit la suppression de la translocation nucléaire suggérant que la contraction de l'actomyosine, contrôlée par RhoA, est nécessaire au déroulement de la nucléokinèse (Ota et al., 2014). D'autres parts, des défauts de translocation nucléaire sans problème de positionnement de centrosome ont été observé dans des neuroblastes portant une mutation dans le gène *Dcx* (Koizumi et al., 2006). Ceci suggère que les microtubules et les moteurs moléculaires associés sont impliqués dans la translocation nucléaire en coordination avec les contractions d'actomyosine. Selon le modèle actuel, le mouvement en avant du centrosome précédant celui du noyau permet l'addition de forces de tension dans le réseau de microtubules entourant le noyau, appelé cage périnucléaire. Le noyau est ensuite tiré vers le centrosome grâce à l'action de la dynéine sur les fibres de microtubules (Rivas and Hatten, 1995; Solecki et al., 2004; Tsai and Gleeson, 2005; Xie et al., 2003). Les forces de poussée générées à l'arrière du corps cellulaire par la contraction de l'actomyosine complèteraient l'action pour une nucléokinèse efficace (Bellion et al., 2005; Martini and Valdeolmillos, 2010; Schaar and McConnell, 2005).

1.5. Mécanismes de contrôle de la migration neuronale

Ma thèse se concentre sur la migration des neuroblastes dans le CMR. Je m'intéresserai donc dans cette partie uniquement aux facteurs régulant la migration tangentielle dans ce système.

1.5.1. Facteurs chimiques

De nombreux facteurs solubles décrits comme attractifs ou répulsifs dans la navigation axonale sont également impliqués dans la régulation de la migration dans le CMR. Je citerai ici quelques exemples.

- *Slit* : Les ventricules latéraux sont couverts de cellules épendymaires ciliées dont le battement synchronisé crée un flux caudo-rostral de liquide céphalorachidien (LCR) dans les ventricules. Dans des souris mutantes *Tg737^{orp}* caractérisées notamment par des défauts de

cils épendymaires, le flux de LCR est perturbé et des défauts de migration des neuroblastes issus de la ZSV sont observés (Sawamoto et al., 2006). Les auteurs ont également montré que les battements ciliaires permettaient de former un gradient de signaux chémorepulsifs de Slit qui est nécessaire à l'orientation de la migration des neuroblastes dans la ZSV. Une autre étude a montré que Slit était sécrété dans la partie postérieure du cerveau et que ses récepteurs, Robos, sont exprimés dans la ZSV et par les neuroblastes en migration dans le CMR (Nguyen-Ba-Charvet et al., 2004).

- Sonic Hedgehog (Shh) : Elodie Angot et ses collègues ont caractérisé la présence de Shh dans le liquide céphalorachidien (LCR) et la présence d'un récepteur de cette voie, Smoothened, dans les neurones en migration dans le CMR (Angot et al., 2008). La greffe de cellules exprimant Shh à proximité du CMR conduit au détachement des cellules en migration du CMR et leur migration vers la source de Shh. Inversement, le blocage de la voie par injection intraventriculaire d'un anticorps contre Shh induit la facilitation de la migration des neurones avec une augmentation de leur vitesse de migration. Ces données suggèrent que Shh présent dans le LCR freine la migration des jeunes neurones vers le BO.

- VEGF/BDNF : Plusieurs facteurs de croissances ou neurotrophiques ont été identifiés comme molécules attractives pour la migration dans le CMR.

Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) est exprimé dans la ZSV et par les cellules gliales du CMR (Balenci et al., 2007). Lorsqu'on inactive le récepteur VEGFR1 dans des souris de manière constitutive, la migration dans le CMR est ralentie (Wittko et al., 2009).

Le Brain derived Neurotrophic Factor (BDNF) et son récepteur TrkB sont exprimés dans le CMR et les BO chez le rongeur adulte (Mackay-Sima and Chuahb, 2000) et le blocage pharmacologique de la voie BDNF/TrkB inhibe la migration des neuroblastes du RMS (Chiaromello et al., 2007).

- Sérotonine : dans un article récent, l'équipe d'Hannah Monyer montre élégamment que les projections sérotoninergiques issues du raphé post-natal s'alignent avec le CMR et que la signalisation de la sérotonine sur son récepteur 5-HT3A régule la vitesse et la directionnalité des neurones (García-González et al., 2017).

1.5.2. Facteurs d'adhésion

Les interactions cellulaires et avec la matrice extracellulaire jouent également un rôle fondamental dans la modulation de la migration dans le CMR.

- Les métalloprotéases matricielles (MMPs) : Ce sont des protéases principalement connues pour leur rôle dans les métastases et l'invasion d'un tissu (Kessenbrock et al., 2010). Les cellules du CMR expriment certaines MMPs et leur activité est nécessaire pour la migration des neuroblastes. En présence d'un inhibiteur de MMP, la vitesse de migration des neuroblastes est réduite (Bovetti et al., 2007).

- Les intégrines $\alpha\beta1$ sont également exprimées par les neuroblastes en migration dans le CMR et elles interagissent avec la laminine présente dans la matrice extracellulaire pour guider la migration (Emsley and Hagg, 2003). Le blocage des intégrines conduit à la perturbation de la migration en chaîne avec la dispersion des cellules en migration (Emsley and Hagg, 2003; Murase and Horwitz, 2002).

- NCAM : Les interactions homophiliques sont essentielles dans le maintien des chaînes de migration. NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) est une molécule d'adhésion cellulaire majeure exprimée par les neurones en migration. Dans les souris déficientes pour NCAM, le bulbe olfactif est petit et les neurones en migration s'accumulent dans la partie caudale du CMR près de la ZSV (Cremer et al., 1994; Hu et al., 1996). Dans le CMR, les NCAM sont polysialylées (Hu et al., 1996). Retirer le motif de polysialylation induit une dispersion des neurones in vivo et in vitro (Battista and Rutishauser, 2010; Chazal et al., 2000).

- N-Cadhérines : Les N-Cadhérines sont exprimées dans les neurones en migration du CMR (Yagita et al., 2009) et sont impliquées dans les adhésions homophiliques au sein des complexes de pseudo-jonctions adhérentes (Yagita et al., 2009).

- Le système vasculaire participe également à la migration de deux manières différentes. Il assure d'une part le transport de l'oxygène, des nutriments et des facteurs solubles sécrétés et d'autre part sert d'échafaudage physique sur lequel les cellules peuvent s'appuyer pour migrer (Bovetti et al., 2007; Snapyan et al., 2009).

2. LE CIL PRIMAIRE

2.1. Historique

2.1.1. Nom et découverte du cil primaire

Dans cette partie et la suivante les articles du XIXe siècle sont référencés dans Bloodgood, 2009. car ils ne sont pas présents dans PubMed

A l'origine, on parlait de cil lorsque la surface de la cellule comportait plusieurs cils tandis que le terme de flagelle central était utilisé lorsqu'il n'existait qu'un seul cil. En 1968, à partir d'études déjà publiées, Sergei Sorokin observe que le cil primaire est le premier des cils à être construit à la surface de la cellule avant de disparaître définitivement ou de laisser place aux cils motiles. Il écrit : « le cil rudimentaire est connu pour être présent dans une grande variété de cellules et qu'il n'a qu'une existence transitoire [...] » (Sorokin, 1968). Il propose alors le terme de cil primaire qui est encore utilisé par la communauté scientifique actuellement.

L'observation du cil primaire fut difficile pendant longtemps à cause de la mauvaise qualité des préparations et de la mauvaise résolution optique des microscopes. Le manque d'étude a entretenu le flou autour de sa fonction et de son nom par la même occasion. Néanmoins, les premières observations du cil primaires remontent à la fin du XIXème siècle. Entre 1844 et 1876, plusieurs études de différents laboratoires montrent la présence de ce petit organite à la surface de cellules épithéliales de différents tissus de deux espèces animales différentes, la lamproie et l'amphioxus. Par exemple, Kowalevsky rapporte que « toutes les cellules [...] sont couvertes de nombreux cils et que ceux-ci disparaissent à une étape ultérieure pour être remplacés par un flagelle sur chaque cellule ». Cependant, on attribue souvent à tort la découverte du cil primaire à Karl Wilhelm Zimmermann en 1898. Zimmermann est en fait le premier à l'avoir décrit à la surface de cellules de mammifères dans un article publié en 1898 tiré d'observations de cellules épithéliales glandulaires de mammifères.

2.1.2. 1898, l'hypothèse Henneguy-Lenhossek

Pendant longtemps, les différentes fonctions supportées par le centrosome ont représenté un casse-tête pour les scientifiques, cristallisé par l'hypothèse Henneguy-Lenhossek (H-L). En 1898, Henneguy et Lenhossek publient deux papiers dans lesquels ils proposent l'idée simple que le centrosome et le corps basal sont un seul et même organite. La conséquence de cette hypothèse est que les cellules ciliées sont incapables de se diviser tant que le cil est présent puisque le centrosome est mobilisé par le cil primaire.

Les centrioles et les corps basaux partagent des caractéristiques morphologiques : taille et forme similaire, position intracellulaire similaire, même coloration avec l'hématoxylin-fer ou avec la microscopie polarisée. En 1970 et 1976, Friedlander et Wahrlan puis LaFountain montrent dans les cellules méiotiques de spermatocytes d'insectes que le centrosome sert à la formation du fuseau mitotique puis de corps basal pour le cil primaire (Friedländer and Wahrman, 1970; LaFountain, 1976). Malgré la présence de solides arguments en faveur de l'hypothèse H-L, certains persistaient à la réfuter. Parmi les quelques scientifiques opposés à l'hypothèse, Erhard fait figure de leader avec ses observations de cellules ciliées en mitose. Malheureusement pour lui, un certain nombre d'observations était en fait des superpositions de cellules ciliées et de cellules en division.

Aujourd'hui, l'hypothèse H-L est communément admise même si peu de personne ont entendu parler de cette théorie par son vrai nom.

2.1.3. Microscopie électronique et redécouverte du cil primaire

Dans les années 1960, le développement de la microscopie électronique à transmission (MET) et son application à différents tissus et types cellulaires ont participé à la « redécouverte » du cil primaire. Les nombreux rapports d'observation consécutifs à l'utilisation de cette méthode de microscopie ont permis la découverte du cil primaire dans de nouveaux types cellulaires comme les neurones ou les cellules pulmonaires dans lesquels ils n'avaient pas été observés auparavant (Palay, 1960; Sotelo and Trujillo-Cenoz, 1958).

Le second avantage de cette technique est de pouvoir accéder à l'ultrastructure des objets que l'on observe. Sotelo rapporte dans son étude la structure 9+0 caractéristique du cil primaire. L'association de l'axonème aux centrioles est découverte plus tard par Barnes (Barnes, 1961) avec l'étude du cil primaire des cellules de la glande pituitaire. L'avancée majeure suivante fut la découverte du processus d'assemblage du cil (Sorokin, 1968). A partir de l'observation

d'une grande quantité de tissus, les auteurs ont décrypté les différentes étapes de la ciliogénèse des cils primaires et des cils motiles (Sorokin, 1968).

2.1.4. L'âge d'or du cil primaire

Les années 1980 représentent une période de stagnation pour la recherche sur le cil primaire. Mais les projecteurs se sont à nouveau braqués sur le cil avec la découverte du transport intraflagellaire dans les flagelles des *Chlamydomonas* par Kozminski en 1993 (Kozminski et al., 1993). Par la suite, il a été montré que le transport intraflagellaire est nécessaire pour l'assemblage et le maintien du cil primaire (Rosenbaum and Witman, 2002).

Entre 2000 et 2005, un certain nombre d'événements a contribué à une augmentation forte de l'intérêt porté au cil s'étendant aux domaines de la physiologie, la biologie développementale, la signalisation cellulaire et la recherche médicale : la démonstration d'un rôle de détection de flux par les cils primaires du tubule rénale (Praetorius and Spring, 2005), la découverte de défauts ciliaire dans la souris Oak Ridge Polycystique Kidney disease (ORPK, Lehman et al. 2008), la découverte du rôle central du cil primaire dans l'établissement de l'asymétrie gauche-droite (Satir and Christensen, 2007), l'association du cil primaire avec les systèmes de signalisation cellulaire majeure chez les mammifères et en particulier Shh (Goetz and Anderson, 2010; Huangfu et al., 2003).

Auparavant, seulement deux ciliopathies étaient connues comme telles, le syndrome de Kartagener et le syndrome d'Usher. C'est l'étude de la souris ORPK qui a permis de mettre en lumière les nombreuses ciliopathies dans lesquelles le cil primaire était affecté. Elle a été décrite pour la première fois en 1994 (Moyer et al., 1994). Dans ce modèle, un large éventail de défauts a été observé incluant des malformations hépatiques et pancréatiques, une dégénérescence rétinienne, des problèmes de squelette, une hypoplasie cérébelleuse, un *situs inversus*, une hydrocéphalie (Lehman et al., 2008). L'étude de ce mutant a permis de mettre en évidence le rôle essentiel du cil primaire dans une large gamme de processus cellulaires et d'étendre le nombre de ciliopathies détectées.

2.2. Structure

Grâce aux études en microscopie électronique, la structure du cil primaire est aujourd'hui connue. Elle est caractérisée par trois attributs : (i) une présence à la surface de la plupart des cellules eucaryotes (Wheatley et al., 1996), (ii) un cytosquelette qui lui est propre

appelé axonème central constitué de neuf paires de microtubules (Sorokin, 1962), (iii) un transport intraflagellaire qui achemine les différents cargos dans et en dehors du cil primaire (Kozminski et al., 1993).

La figure 14 résume les caractéristiques principales qui sont discutées dans chacun des paragraphes suivants.

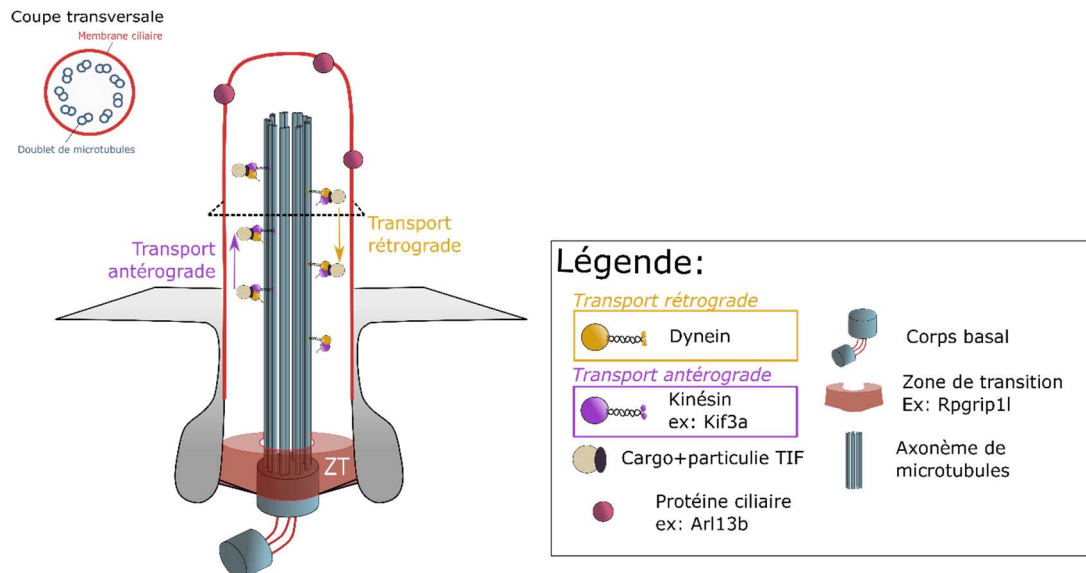


Figure 14 : Le cil primaire est un petit organelle présent à la surface de la plupart des cellules eucaryote et joue le rôle d'antenne pour la cellule.

Il est relié au corps basal par un axonème central de microtubules. Il possède son propre système de transport intraflagellaire et est isolé du reste de la cellule grâce à la zone de transition située à sa base. Abréviation : ZT, Zone de transition.

2.2.1. Axonème

Les neuf triplets de microtubules qui forment notamment le centriole père se transforment en neuf doublets de microtubules qui se superposent de la base du cil primaire jusqu'à l'apex du cil. Les cils motiles possèdent en plus un doublet central de microtubule sur lequel des dyneines se déplacent ce qui permet un mouvement du cil.

En fonction de la présence ou de l'absence des doublets centraux de microtubules, on distingue deux modèles de cil. Les cils motiles font généralement partis du modèle 9+2, pour neuf doublets de microtubules et deux doublets centraux de microtubules. Les cils primaires non motiles sont associés au modèle 9+0 (Figure 14, en haut à gauche). Néanmoins, cette dichotomie peut être nuancée puisqu'il existe des exceptions dans les deux cas. On peut citer notamment les exemples des cils primaires de certaines cellules sensorielles de l'épithélium

olfactif des mammifères ou des cellules ciliées de l'appareil vestibulaires de certains vertébrés (Flock and Duvall, 1965). Leurs cils sont 9+2 mais sont incapables de bouger puisqu'ils leur manquent les dynéines axonémales nécessaires à la rotation. De la même manière, il existe des cils 9+0 qui sont capables de bouger comme chez les gamètes mâles des diatomées (Corbière-Tichane, 1971).

2.2.2. Zone de transition et adressage

Malgré la continuité entre la membrane plasmique du cil primaire et le reste de la cellule, le cil primaire est un organite à part entière. A la base du cil, la zone de transition filtre les entrées et sorties du cil primaire (Figure 14, ZT). La structure de la zone de transition est extrêmement similaire aux pores nucléaires (Christensen and Ott, 2007).

A l'heure actuelle, aucune traduction locale au niveau du cil primaire n'a été découverte. Les protéines présentes au niveau du cil primaire doivent donc être adressées au cil primaire et passer la zone de transition.

Pour les protéines transmembranaires, deux moyens d'adressage différents sont utilisés. Les protéines sont concentrées dans des vésicules d'exocytose spécifiques provenant de l'appareil transgolgien. Les vésicules sont transportées jusqu'à la base du cil où elles fusionnent avec la membrane ciliaire. Ces molécules portent souvent une séquence d'adressage au cil, de petite taille : VXPX où X représente n'importe quel acide aminé (Christensen and Ott, 2007). Ce processus a été particulièrement étudié dans le segment externe des photorécepteurs de la rétine chez les vertébrés (Pearring et al., 2013).

Les protéines peuvent également diffuser par transport latéral entre la membrane plasmique et la membrane ciliaire. Par exemple, le récepteur à la dopamine D1 ou le récepteur Smoothed sont adressés au cil primaire par diffusion latérale grâce à l'interaction entre leurs parties cytoplasmiques et des complexes de transport intraflagellaire B (Leaf and Von Zastrow, 2015; Milenkovic et al., 2009).

Dans le cas de protéines cytosoliques, l'adressage au cil ne nécessite pas l'utilisation de vésicules de transport. Les protéines doivent cependant passer par les pores de la zone de la barrière de diffusion. A ce niveau, les protéines interagissent avec des moteurs moléculaires ciliaires du système de transport intraflagellaire (Qin et al., 2005; Rosenbaum and Witman, 2002).

2.2.3. Transport intraflagellaire

Le système de transport intraflagellaire (STIF) est un système de transport bidirectionnel utilisant l'axonème comme rail pour le transport le long du cil (Figure 14). La dynamique de transport intraflagellaire a été observée pour la première fois par microscopie à contraste interférentiel et microscopie électronique dans les flagelles de *Chlamydomonas* (Kozminski et al., 1993). De gros complexes sont déplacés de la base du cil vers l'appendice distal grâce à la kinesin 2. Le transport rétrograde fait intervenir un autre moteur moléculaire, la dynéine cytoplasmique 2 (Rosenbaum and Witman, 2002). Chez la souris et l'homme, la kinésine 2 est formée de deux complexes appelés KIF3A et KIF3B (Scholey, 1996). La délétion conditionnelle du gène KIF3A dans des modèles cellulaires ou des lignées de souris a permis l'étude du rôle du cil primaire dans de nombreuses conditions (pour la migration neuronale par exemple, Baudoin et al., 2012).

2.3. Ciliogénèse

La ciliogénèse ou assemblage du cil primaire est un processus en quatre étapes très bien décrites et qui démarre lorsque la cellule quitte le cycle mitotique en réponse à une absence de molécules mitogènes ou de facteurs de différenciations (Archer and Wheatley, 1971; Pedersen et al., 2008; Sorokin, 1962). De petites vésicules provenant de l'appareil de Golgi s'accumulent autour de l'extrémité distale du centriole père. La fusion de ces vésicules autour du centriole permet la création de la vésicule ciliaire dans laquelle l'axonème commence à émerger (Figure 15, étape 1). De nouvelles vésicules viennent fusionner avec la nouvelle membrane pour créer une poche ciliaire entourant l'axonème et dans laquelle les paires de microtubules viennent s'ajouter et participer à l'extension du cil primaire (Figure 15, étape 2). Ce gros complexe est adressé à la membrane avec laquelle il fusionne ensuite permettant l'exposition du jeune cil primaire à la surface de la cellule (Figure 15, étape 3). La ciliogénèse se termine avec l'ajout de doublets de microtubules à l'extrémité distale du cil primaire jusqu'à ce qu'il atteigne la taille requise (Figure 15, étape 4). L'extension du cil primaire est réalisée grâce au STIF.

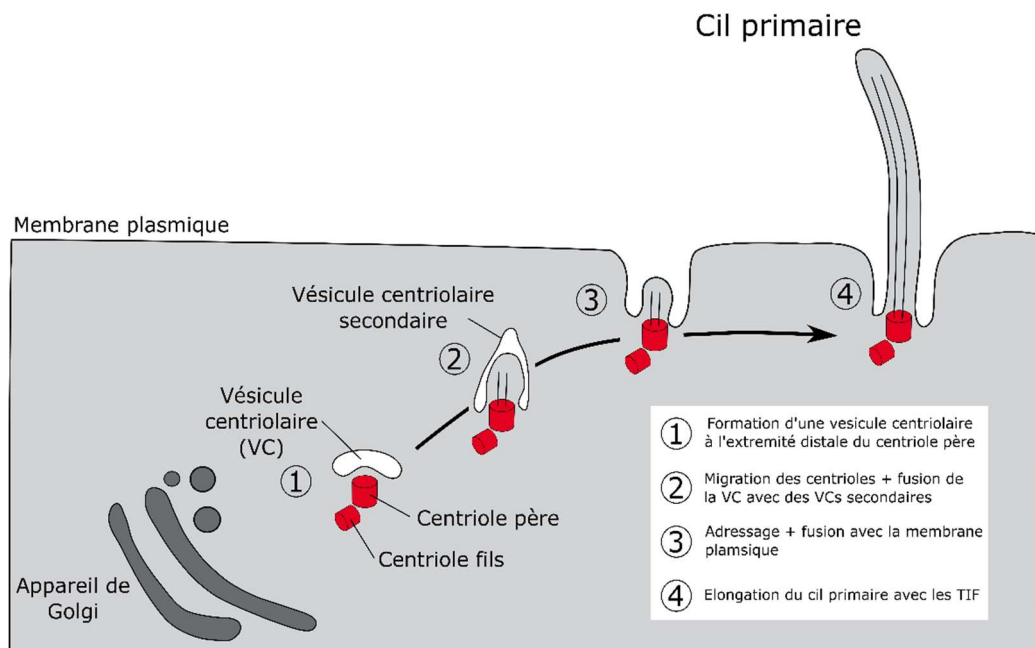


Figure 15 : La ciliogénèse est réalisée en 4 étapes distinctes.

Le cil primaire est assemblé à partir du centriole père et de la fusion de vésicules centriolaires. Les microtubules sont ensuite ajoutés successivement par fusion de nouvelles vésicules avant que le cil ne soit adressé à la membrane et exposé à la surface de la cellule

2.4. Transduction des signaux par le cil primaire

2.4.1. Détection des molécules chimiques

La découverte de la nécessité du cil primaire pour la voie de signalisation Sonic Hedgehog a propulsé le cil primaire au centre de l'intérêt porté à la physiologie cellulaire (Huangfu et al., 2003) et a mené à la découverte de nombreuses voies de signalisation passant par le cil. Le tableau de la figure 16 présente sous forme de tableau les principaux récepteurs localisés au niveau du cil primaire ainsi que les résultats importants tirés des différentes études.

2.4.2. Détection des signaux mécaniques

Le cil primaire est présent à la surface des cellules et est exposé à l'environnement extracellulaire. Sa localisation et sa forme amènent naturellement à se questionner sur son rôle possible de mécanotransduction. Dès 1898, Zimmermann écrivait « *On pourrait également imaginer que ce délicat flagelle, dont les mouvements n'ont sans doute aucun impact significatif sur les sécrétions présentes dans la lumière des glandes, pourrait fonctionner comme une sorte d'organe sensoriel. Des changements dans la configuration des fluides de*

Molécule	Récepteur	Bibliographie	Résultat principal
Dopamine	D1R, D2R, D5R	Marley et al. 2010	L'expression de version taggées des D12, D2R et D5R dans des NIH3T3 a permis de montrer la forte concentration de ces récepteurs à la membrane du cil primaire
Galanine	GALR2, GALR3	Loktev et al. 2013	Grâce à un screen, 5 RCPGs ont été localisés au niveau du cil primaire. Dans une souris modèle de mutant du Bbosome, ces récepteurs ne sont plus adressés au cil primaire et les voies de signalisations sont perturbées. L'expression du récepteur NPY5R permet de sauver le phénotype mutant et restaurer les fonctions ciliaires.
Kisspeptine	KISSR1	Koemeter-cox et al. 2014	Le récepteur à la Kisspeptine est enrichi au niveau du cil primaire des neurones GnRH. La perturbation de la ciliogénèse spécialement dans les neurones GnRH induit une diminution de l'activité modulée par la Kisspeptine suggérant un rôle du cil primaire dans la sensibilité de ces neurones à la Kisspeptine
Neuropeptide	NPY5R	Loktev et al. 2013	Grâce à un screen, 5 RCPGs ont été localisés au niveau du cil primaire. Dans une souris modèle de mutant du Bbosome, ces récepteurs ne sont plus adressés au cil primaire et les voies de signalisations sont perturbées. L'expression du récepteur NPY5R permet de sauver le phénotype mutant et restaurer les fonctions ciliaires.
Odeurs	RCPGs olfactifs	Schou et al. 2015	Les RCPGs olfactifs sont présent à la membrane des cils primaires des neurones sensoriels olfactifs
Photons	Opsines	Sun et al. 2012	Les opsines sont présents à la membrane des photorécepteurs des cellules ganglionnaires rétiniennes qui sont des cils primaires modifiés
Prolactin-releasing Hormone	PRLHR	Omori et al. 2015	Le récepteur de la PRLH est localisé au cil primaire. Dans la souris mutante développée, l'assemblage du cil primaire est perturbée et conduit à une augmentation du poids de la souris.
Sérotonine	HT6R	Brailov et al. 2000 ; García-González et al. 2017	Le récepteur 5HT6R est associé à la membrane du cil primaire comme le montre les immunohistochimies. Le récepteur 5HT3A est également présent. Les axones sérotoninergiques alignés avec le courant de migration rostrale exercent un contrôle sur la vitesse et la directionnalité de migration. La stimulation de ces fibres induit une augmentation de la vitesse de migration. Dans les souris HTR3-/- la migration est perturbée avec une diminution de la vitesse de migration et un comportement de migration erratique.
Somatostatine	SST3R	Handel et al. 1999	Les auteurs ont observé une immunoréactivité de SST3R dans de nombreuses régions cérébrales incluant le cortex, l'hippocampe, l'amygdale ou le cervelet. Dans ces régions à l'exception du cortex, l'immunoréactivité est concentrée au niveau du cil primaire.
Sonic Hedgehog	Smo	Corbit et al. 2005 ; Baudouin et al. 2012	Le récepteur de Shh, Smoothened, est exprimé au niveau du cil primaire. La perturbation de la ciliogénèse dans deux modèles de souris mutantes (Kif3 a et Ift88) induit la perte de sensibilité des neurones à Shh. Le blocage de la voie Shh induit le même phénotype. En revanche, l'application d'un agoniste de Smo permet de restaurer le phénotype suggérant de l'activité Shh est dépendante du cil primaire.
PDGFαα	PDGFRαα	Schneider et al. 2005	En condition normale, les cellules sont capables de détecter un gradient de PDGFαα et de migrer vers celui-ci. Dans les fibroblastes de souris ORPK dans lesquels l'assemblage du cil primaire est perturbé, la migration vers le gradient de PDGFαα est absente, associée à un déplacement ératique et une vitesse de migration élevée. Ces défauts conduisent à des perturbations de la cicatrisation dans ce modèle de souris.
Wnt	FZD3	Corbit et al. 2008	Les auteurs utilisent trois mutants de ciliogénèse différents (affectant Kif3a, Ift88 et Ofd1) et montrent que le cil primaire freine l'activité canonique de Wnt dans l'embryon, les fibroblastes primaires et les cellules souches embryonnaires. La perte du cil primaire induit la suractivation de la voie de signalisation Wnt. Le blocage de la phosphorylation de Dvl, un acteur de cette cascade permet de restaurer le phénotype.
PACAP	PAC1	Schou et al. 2015	PACAP est situé au niveau du cil primaire et fait partie de la signalisation Shh.

Figure 16 : Tableau récapitulatif (non exhaustif) des molécules dont les récepteurs sont présents au niveau du cil primaire.

(Baudouin et al., 2012 ; Brailov et al., 2000 ; Corbit et al., 2005, 2008 ; García-González et al., 2017 ; Händel et al., 1999 ; Koemeter-Cox et al., 2014 ; Loktev and Jackson, 2013 ; Marley and von Zastrow, 2010 ; Omori et al., 2015 ; Schneider et al., 2005 ; Schou et al., 2015)

sécrétion [à l'intérieur de la lumière des glandes] pourrait avoir un effet stimulant sur le flagelle au moyen duquel la fonction sécrétrice pourrait être affectée de manière qualitative ou quantitative ».

En 1997, Bowser et ses collègues montrèrent que le cil primaire de cellules rénales en cultures était capable de se plier en réponse à des flux de liquides similaires à ceux observés *in vivo* dans le tubule rénal (Schwartz et al., 1997). Plus tard, l'utilisation de biosenseurs calciques dans des cellules rénales en culture permis à l'équipe de Praetorius de mettre en évidence une augmentation de calcium intraciliaire en réponse à la courbure du cil primaire (Praetorius and Spring, 2005).

Mais en 2016, les données publiées par Delling sont en contradictions avec celles de Praetorius. Malgré l'adressage spécifique au cil d'une nouvelle génération de biosenseur sensible au calcium et de l'application de différents courants de forces différentes dans un certain nombre de types cellulaires, ils ne purent jamais détecter de modification de concentration de calcium dans le cil. En revanche, les auteurs expliquent que l'augmentation de la concentration calcique observée dans les précédents articles pourrait être expliquée par la diffusion passive du calcium depuis le cytoplasme de la cellule jusque dans le cil primaire (Delling et al., 2016).

Dans ce contexte de débat autour du rôle de mécano transduction du cil primaire avec le calcium comme second messenger, l'équipe de Nag et Resnick développa un modèle mathématique pour tester *in silico* les différentes hypothèses. En utilisant les données biophysiques de nombreuses publications, leur modèle permis de conclure que le cil pouvait jouer ce rôle mais que le calcium n'était pas nécessairement le second messenger utilisé (Nag and Resnick, 2017). L'AMPC pourrait représenter une alternative intéressante étant donné sa grande concentration dans le cil primaire (Moore et al., 2016).

2.5. Rôle dans le neurodéveloppement

Les progéniteurs neuronaux et les neurones en développement rassemblent un cil primaire. Le rôle du cil primaire dans le développement du cerveau et le fonctionnement du cerveau est évident lorsque l'on regarde la structure du cerveau dans les ciliopathies comme par exemple les syndromes de Joubert, de Meckel-Gruber ou de Bardet-Biedl. L'équipe d'Eva Anton a formé une librairie de shARN qui ciblent une trentaine de gènes connus pour être liés à des ciliopathies humaines et des défauts neurologiques (Guo et al., 2015). L'utilisation de ces sh par électroporation *in utero* dans des cerveaux embryonnaires de souris a permis de

mettre en lumière de manière plus précise le rôle fondamental du cil primaire dans toutes les étapes de corticogénèse depuis la neurogénèse jusqu'à l'intégration des neurones en passant par la migration (Guo et al., 2015).

2.5.1. Neurogénèse

Dès sa découverte, le cil primaire a été identifié comme une antenne potentielle de la cellule servant à la détection de morphogènes et de facteurs de croissance. En ce qui concerne les cellules souches neurales de la ZSV qui bordent les ventricules cérébraux, sa localisation unique dans la lumière des ventricules suggère qu'il pourrait jouer un important rôle dans la détection de signaux du liquide céphalo-rachidien. Le laboratoire d'Arturo Alvarez-Buylla a réalisé l'ablation du cil primaire dans les cellules progénitrices de la ZSV et leur descendance en utilisant des allèles conditionnels de gènes essentiels dans le transport intraflagellaire comme *Ift88* ou *Kif3a*. Cette délétion induit la diminution de la neurogénèse dans un domaine de la ZSV ventrale qui répond à *Shh*, montrant le rôle essentiel du cil primaire dans la modulation de la neurogénèse dans la ZSV (Tong et al., 2014).

Dans l'hippocampe, second siège de neurogénèse adulte chez le rongeur, le cil primaire joue également un rôle crucial (Han et al., 2008). Dans ce système, la perturbation de la ciliogénèse ou de la voie de signalisation *Shh* conduit à des défauts de neurogénèse. Inversement, l'expression d'une forme constitutivement active de *Smo*, le récepteur de *Shh*, permettant une suractivation de la voie, augmente de manière importante le nombre de neurones générés dans l'hippocampe se traduisant par une expansion du gyrus dentelé. La neurogénèse post-natale hippocampique requiert donc une signalisation *Shh* active et un cil primaire fonctionnel.

Par ailleurs, l'étude de Guo et al (Guo et al., 2015) montre que plusieurs gènes impliqués dans des ciliopathies (*BUBR1*, *IFT 80* ou *KIF7* notamment) sont des modulateurs de la prolifération de progéniteurs corticaux .

Plus précisément, la mutation de *BUBR1* est à l'origine du syndrome de séparation des chromatides prématurée, une ciliopathie caractérisée par une microcéphalie et un retard mental (Suijkerbuijk et al., 2010). *Bubr1* est localisé au centrosome/corps basal et est un composant-clé du complexe protéique nécessaire à la formation du fuseau mitotique durant la mitose (Hildebrandt et al., 2011). Un niveau d'expression insuffisant de *Bubr1* induit la dérégulation du cycle cellulaire et des défauts de ciliogénèse (Miyamoto et al., 2011).

2.5.2. Migration neuronale

Les fibroblastes sont un excellent modèle de l'étude *in vitro* de la migration cellulaire. En 1977, Albrecht-Buehler observe après marquage avec des billes d'or dans ces cellules en migration une corrélation entre la direction vers laquelle pointait le cil primaire et la direction de migration (Albrecht-Buehler, 1977). Il en conclut que le cil primaire pourrait jouer un rôle dans le contrôle directionnel de la migration des NIH3T3. Plus récemment, l'équipe de Christensen a montré que le cil primaire agissait dans ces cellules comme une antenne sensorielle qui était capable de détecter des signaux extracellulaires comme un gradient de PDGF α et de modifier en conséquence la direction de migration (Schneider et al., 2009, 2010).

En ce qui concerne les neurones, principalement deux études ont montré un rôle similaire du cil primaire dans la migration neuronale (Baudoin et al., 2012; Higginbotham et al., 2012).

D'abord, l'invalidation génétique du cil primaire dans deux mutants conditionnels, Kif3a^{lox/lox} et Ift88^{lox/lox}, altère la capacité des neurones corticaux GABAergiques embryonnaires à se réorienter au niveau de la plaque corticale (Baudoin et al., 2012). Les auteurs ont ensuite cherché à identifier la voie de régulation impliquée dans ce processus de réorientation et dépendante du cil primaire. La voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh) est connue pour être dépendante du cil primaire et son récepteur est localisé au niveau du cil primaire (Huangfu et al., 2003; Pal and Mukhopadhyay, 2015). Le blocage de la signalisation Shh avec la cyclopamine, un antagoniste du récepteur Smo, induit des défauts de migration similaires à ceux retrouvés chez les mutants ciliaires (Baudoin et al., 2012). Inversement, l'activation de cette voie de signalisation avec l'injection de Shh dans le milieu permet de restaurer la capacité de réorientation des neurones. Ceci suggère que la réorientation des interneurons corticaux est un processus qui requiert l'action de Shh au niveau du cil primaire.

Parallèlement, l'équipe d'Eva Anton a réalisé la même étude en utilisant un autre mutant de délétion du cil primaire, la lignée Arl13b^{lox/lox}. La délétion d'Arl13b conduit à la diminution d'expression d'Arl13b, une GTPase ciliaire, connue pour induire le syndrome de Joubert, une ciliopathie. Dans cette étude, Higginbotham et ses collègues démontrent que la délétion d'Arl13b perturbe l'adressage de certains récepteurs au cil primaire sans induire son ablation (Higginbotham et al., 2012). Les neurones mutés sont incapables de répondre à des signaux

attractifs libérés par les cellules corticales dorsales (Robo 1/2 ou TrkB) et ne migrent pas correctement, un phénotype similaire à celui de l'étude de l'équipe de Christine Métin. Ces études établissent clairement un lien entre le cil primaire et la migration ce qui nous a conduit à étudier le rôle du cil primaire dans la migration des neurones du CMR.

Par ailleurs, une autre étude a également montré un rôle indirect du cil primaire dans la migration neuronale à travers le contrôle de la polarité des cellules de glie radiaire. Ces cellules assemblent un cil primaire sur leur surface apicale, vers la lumière des ventricules cérébraux. Dans les souris *Arl13b^{lox/lox}*, la délétion d'*Arl13b* durant les étapes précoces d'embryogénèse perturbe la polarité apico-basale résultant en une inversion de la polarité des cellules de glie radiaire. Les neurones sont incapable de migrer correctement sur ce substrat inversé ce qui conduit à un placement aberrant des neurones corticaux et une inversion complète de l'organisation du cortex (Higginbotham et al., 2013).

2.5.3. Intégration

La persistance du cil primaire dans les neurones après l'étape de migration suggère qu'il pourrait également jouer un rôle dans les étapes d'intégration des neurones dans les circuits existants.

Dans l'hippocampe de souris adultes, les cellules granuleuses du gyrus denté assemblent leur cil primaire parallèlement au développement de l'arborisation dendritique (Kumamoto et al., 2012). Le blocage de l'assemblage du cil dans ces cellules par l'utilisation de stratégies génétiques (dominant négatif *Kif3a* ou *sh Ift88*) conduit à des défauts de maturation des synapses glutamatergiques. Le nombre de courants post synaptiques excitateurs, l'amplitude de ces courants et leur fréquence sont réduits dans les cellules délétées du cil primaire. Le phénotype synaptique est associé à une absence de raffinement de l'arborisation dendritique. Dans le cortex, la perturbation des fonctions ciliaires après délétion de la GTPase *Arl13b* dans les interneurons induit une simplification de leur arborisation dendritique et une réduction de leur taille conduisant à des défauts de balance excitation/inhibition. Ce phénotype peut être sauvé par l'activation de RCPGs ciliaires ou par la surexpression du récepteur à la somatostatine (*SST3R*), connu pour être ciliaire, dans les neurones *Ar13b* déficient (Guo et al., 2017). Ces résultats montrent que le cil primaire est requis pour la formation des circuits inhibiteurs et la connectivité interneuronale dans le cortex.

L'ensemble de ces études suggère que le cil primaire joue un rôle dans toutes les étapes de la vie des neurones depuis leur naissance jusqu'à leur intégration dans le réseau.

Nous avons d'ailleurs pu constater pendant mon M2 que les neurones nouvellement générés par la ZSV adulte pouvaient assembler un cil à chaque étape de leur maturation et est maintenu dans les neurones matures, ce qui est résumé dans la figure 17.

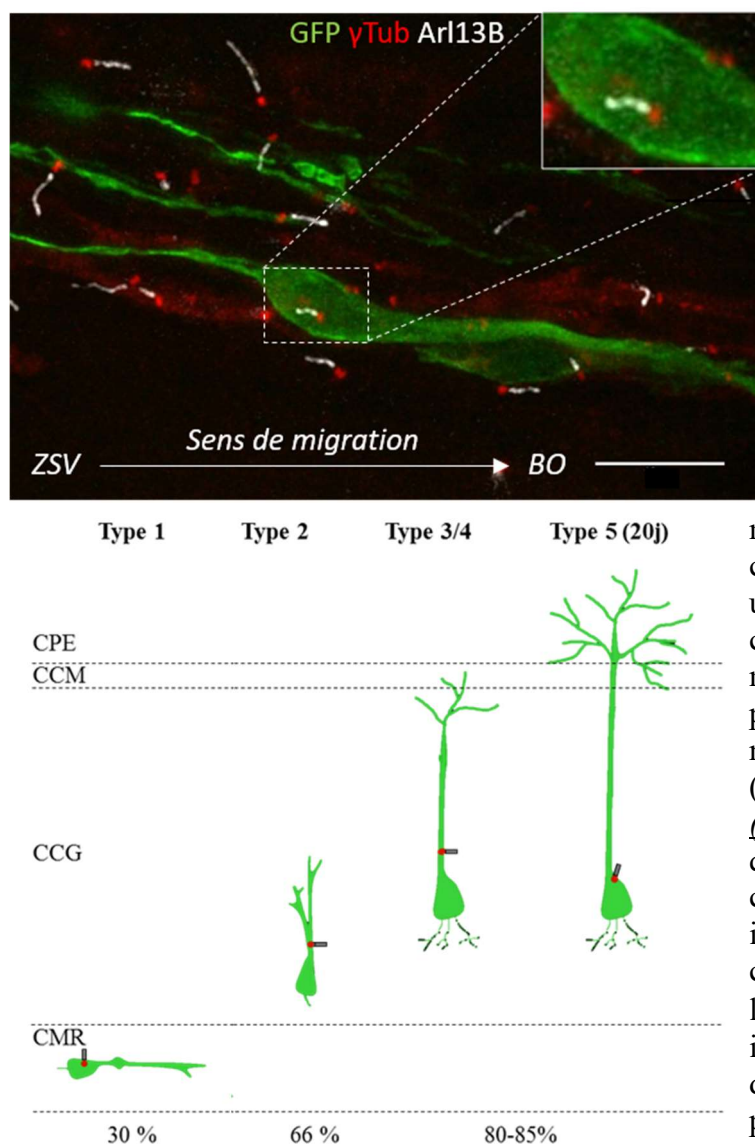


Figure 17 : Schéma récapitulatif des caractéristiques du cil primaire au cours des différentes étapes de migration et de différenciation des neurones granulaires du BO adulte (résultats de M2).

(Haut) Immunohistochimie sur coupe de cerveau de souris Swiss injectée avec un lentivirus GFP dans la ZSV. Marquage anti GFP (vert), anti- γ tubuline (rouge) et anti-Arl13b (gris). La flèche montre le sens de migration des cellules. On observe en particulier une cellule avec la morphologie caractéristique de cellule en migration tangentielle qui porte un cil primaire associé à son centrosome au niveau de son corps cellulaire (insert). Barre d'échelle : 10 μ m.

(Bas) Les pourcentages de cellules qui assemblent un cil primaire à chaque stade de maturation sont indiqués en bas. Un cil est compté comme appartenant à une cellule lorsqu'un centrosome γ Tub immunopositif est clairement détecté dans la cellule et qu'un cil Arl13B positif y est attaché comme en haut. Les cellules dont le centrosome n'est

pas détecté ne sont pas comptabilisées. Les différents types de cellules sont définis selon la classification de (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002) comme dans la figure 5. Le pourcentage de cellules présentant un cil détectable varie selon les stades. Ces résultats obtenus sur tissu fixé montrent que chaque stade peut assembler un cil mais les pourcentages ne sont pas faciles à interpréter (Par exemple, le pourcentage de 30% de cellules de type 1 portant un cil peut refléter le fait que peu de cellules ont un cil ou que ce cil est présent dans un large pourcentage de cellules mais qu'il est extrêmement dynamique). Abréviations : (CCG) couche des cellules granulaires, (CCM) couche des cellules mitrales, (CMR) courant de migration rostral, (CPE) couche plexiforme externe.

3. L'ADENOSINE MONOPHOSPHATE CYCLIQUE (AMPc)

3.1. Rôles de l'AMPc dans le développement du système nerveux

De multiples étapes du développement du système nerveux impliquent l'activation de cascades de signalisation impliquant l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (Averaimo and Nicol, 2014). Par exemple, la polarisation neuronale, processus par lequel un neurone choisit un de ces neurites comme axone, nécessite la signalisation par les nucléotides cycliques, AMPc et GMPc (Guanosine monophosphate cyclique) (Shelly et al., 2010). Dans les neurites en cours de différenciation dans des neurones hippocampiques en culture, les activités locales de l'AMPc et du GMPc activent et suppriment respectivement la formation des axones et exerce des effets opposés sur la formation des dendrites. La régulation réciproque de la concentration d'AMPc et de GMPc permet donc de coordonner le développement d'un axone et de plusieurs dendrites.

L'AMPc joue également un rôle essentiel dans la croissance axonale, où de forte concentration d'AMPc favorise l'élongation de l'axone (Cai et al., 2001; Corredor et al., 2012; Roisen et al., 1972; Shewan et al., 2002)

De même, l'AMPc est fondamental pour le guidage axonal. Dans les filopodes des cônes de croissance des neurones en développement, l'activation du récepteur Deleted in Colorectal Cancer (DCC) par la Netrin-1 induit une augmentation locale transitoire de la concentration d'AMPc qui conduit à une augmentation de la fréquence des vagues calciques dans cette partie du neurone (Nicol et al., 2011). L'AMPc produit spécifiquement dans les filopodes régule le guidage axonal en orientant le cône de croissance vers la source de molécule attractive comme Netrin. Enfin, la perturbation des signaux AMPc dans les axones commissuraux de la moelle chez le Xénope leur fait adopter des trajectoires anormales.

L'AMPc intervient également plus tardivement dans la formation des cartes topographiques et dans la compétition synaptique dépendante de l'activité (Averaimo and Nicol, 2014), ce que je ne détaillerai pas ici.

3.2. Cycle de l'AMPc

3.2.1. *Synthèse et cibles*

Les acteurs principaux de la cascade de signalisation de l'AMPc sont bien décrits (Figure 19). Les adénylates cyclases (AC) sont les enzymes qui induisent la cyclisation de

l'AMPc à partir de l'ATP. Elles sont généralement activées par la liaison d'un RCPG à son ligand. Il existe 10 gènes distincts qui codent pour deux classes d'ACs, 9 sont transmembranaires et une est soluble (Cooper and Crosshwaite, 2006).

L'AMPc se lie principalement à trois cibles protéiques : les cyclic-nucleotide-gated ion channel (CNG), les exchange proteins activées par l'AMPc (EPAC) et la protéine kinase A dépendant de l'AMPc (PKA) (Kawasaki et al., 1998; Matulef and Zagotta, 2003; Taylor et al., 2013).

La PKA est constituée de quatre sous-unités : deux sous-unités catalytiques et deux sous-unités régulatrices. Deux molécules d'AMPc peuvent se lier à chacune des sous-unités régulatrices. Cette liaison induit la libération des sous-unités catalytiques qui vont alors phosphoryler un certain nombre de cibles (Taylor et al., 2013).

3.2.2. Dégradation

Une fois produit, l'AMPc est dégradé par une famille diversifiée d'enzyme appelées phosphodiésterases (PDEs, Omori and Kotera, 2007). Comme les ACs, les PDEs participent activement à la régulation du signal AMPc en dégradant rapidement l'AMPc, ce qui permet le caractère transitoire de sa signalisation.

Il existe 8 différentes familles de PDEs (PDE 1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 11). Ces PDEs sont codées par différents gènes qui peuvent être différenciellement épissés, générant une grande diversité isoformes (Zaccolo, 2009). Les différentes isoformes de PDEs sont distribuées différemment

dans les tissus et chaque cellule peut exprimer plusieurs isoformes à la fois.

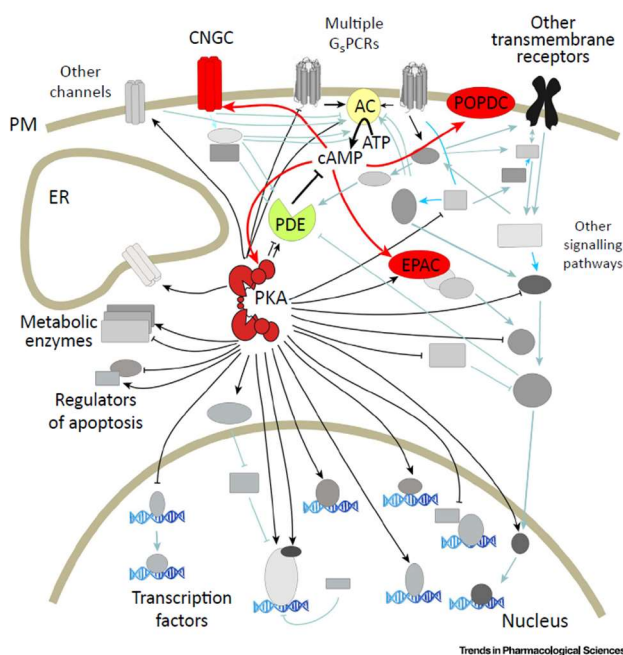


Figure 18 : La voie de signalisation AMPc est extrêmement complexe.

L'AMPc est produit par les ACs après activation de multiples RCPGs. Il est dégradé par les PDEs. Les multiples effecteurs de l'AMPc sont figurés en rouge. Abréviations : (AC) adénylate cyclase, (EPAC) exchange factor directly activated by cAMP, (ER) réticulum endoplasmique, (GPCR) récepteur couplé à une protéine G, (PDE) phosphodiésterase, (PM) membrane plasmique, (POPDC) Popeye domain-containing protein. (Musheshe et al., 2018)

3.3. Compartimentation de l'AMPc

3.3.1. Détection de l'AMPc par biosenseur FRET

La signalisation AMPc a été classiquement étudiée par des méthodes biochimiques peu résolutive aux niveaux spatial et temporel. Le développement de biosenseurs codés génétiquement par l'équipe de Tsien (Adams et al., 1991) a été une révolution dans le domaine. Ils permettent en effet de réaliser des expériences d'imagerie en temps réel sur cellules vivantes avec une grande résolution spatio-temporelle (Jiang et al., 2017; Musheshe et al., 2018).

Il s'agit principalement de biosenseurs FRET (Förster Resonance Energy Transfer) pour lesquels les changements de concentration d'AMPc induisent un changement de longueur d'onde d'émission (Hamers et al., 2014).

Le biosenseur que nous avons utilisé dans notre étude est le EpacS^{H187} (Klarenbeek et al., 2015). Le domaine de reconnaissance de ce biosenseur est composé d'une partie de la protéine EPAC dont le site catalytique a été inactivé, mais qui reste capable de lier l'AMPc. Les fluorophores qui l'encadrent sont la mTurquoise2 et un tandem de cpVenus. En l'absence d'AMPc, la conformation du biosenseur est telle que les fluorophores sont proches ce qui induit un transfert d'énergie FRET entre la mTurquoise2 et la Venus. La fixation de l'AMPc sur le domaine EPAC induit un éloignement physique des deux fluorophores et donc une absence de FRET. A chaque point de temps d'un film, on peut donc mesurer le rapport entre les longueurs d'onde FRET et non FRET pour évaluer la dynamique de l'AMPc.

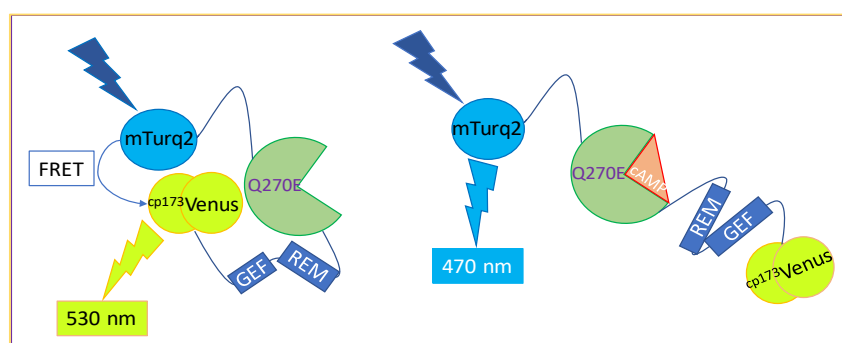


Figure 19 : Principe de fonctionnement du biosenseur EpacS^{H187}.

En l'absence d'AMPc, la conformation du biosenseur est telle que les fluorophores sont proches ce qui induit un transfert d'énergie FRET entre la mTurquoise2 et la Venus. En présence d'AMPc les deux fluorophores s'éloignent physiquement l'un de l'autre et donc le FRET diminue.

3.3.2. *Quelques exemples de compartimentation subcellulaire de l'AMPc*

L'AMPc a été originellement considéré comme un second messager diffusant librement dans la cellule, ce qui posait la question de la spécificité de son action sur certaines cibles. Les études utilisant les biosenseurs FRET ont démontré que l'AMPc était compartimenté dans les cellules et que cette compartimentation contribuait à la spécificité de son action (Jiang et al., 2017; Musheshe et al., 2018). Je décrirai ici quelques exemples marquants de cette compartimentation.

Manuela Zaccolo fut la première à mettre en évidence une compartimentation de l'AMPc avec un biosenseur FRET sensible à l'AMPc (Zaccolo and Pozzan, 2002). Dans les cardiomyocytes de rat nouveau-né, une stimulation bêta-adrénergique induit l'apparition de microdomaines riches en AMPc au niveau de régions spécifiques de la membrane du réticulum sarcoplasmique. Ces microdomaines peuvent agir sur un rayon de 1µm, la diffusion de l'AMPc est limitée par des PDEs et ces gradients activent spécifiquement certaines PKA ancrées à proximité.

En 2012, par utilisation d'un biosenseur FRET adressé au centrosome, son équipe a montré dans les cellules CHO l'existence d'une zone faible en AMPc entourant celui-ci (Terrin et al., 2012). Ce microdomaine est dynamique, disparaît durant la mitose et sa présence est indispensable à la progression du cycle cellulaire.

Plus récemment, chez la drosophile, l'expression transgénique d'un biosenseur FRET dans les motoneurones glutamatergiques de Type1b de la jonction neuro-musculaire a permis de mettre en évidence un contrôle local de la signalisation AMPc au niveau synaptique (Maiellaro et al., 2016). Ces neurones sont activés par l'octopamine qui agit sur des RCPGs synaptiques. L'application locale d'octopamine au niveau de bouton synaptique montre que la réponse AMPc du neurone en aval se limite au bouton lui-même, ce qui révèle un mécanisme local de contrôle de la spécificité synaptique par l'AMPc.

Enfin, deux papiers récemment publiés utilisant des biosenseurs AMPc adressés spécifiquement dans le cil primaire de fibroblastes et de cellules épithéliales de rénales ont montré que le cil primaire était un microdomaine riche en AMPc (Moore et al., 2016; Sherpa et al., 2019) et dont la concentration était jusqu'à cinq fois plus élevée que le reste de la cellule (Moore et al., 2016). Les changements de niveau d'AMPc dans le cil sont indépendants des changements de niveau cytoplasmique montrant la spécificité de la régulation de l'AMPc au niveau du cil primaire.

3.3.3. Mécanismes de compartimentation

La diversité de régulation et de localisation des ACs (10 isoformes) et des PDEs (plus de 40 isoformes) offre une large variété de combinaisons possibles (Figure X, Omori and Kotera, 2007). La coopération entre les adénylates cyclases et les phosphodiesterases est cruciale pour contrôler l'activation du signal AMPc et sa limitation dans le temps et l'espace permettant ainsi son utilisation dans des cascades de réponses à différents stimuli (Figure 20). Les ACs peuvent être localisées au niveau subcellulaire. Les ACs transmembranaires sensibles au calcium (AC1, 3, 5, 6 et 8) peuvent être présentes au niveau des rafts lipidiques à la membrane plasmique de la cellule. Inversement, les ACs transmembranaires insensibles au calcium (AC 2, 4, 7 et 9) sont exclues des rafts lipidiques (Willoughby and Cooper, 2008). Enfin, l'AC10 qui est soluble est présente dans le noyau et les mitochondries (De Rasmio et al., 2015; Zippin et al., 2010). L'adressage à différentes régions de la cellule représente un premier niveau de compartimentation de l'AMPc par la sélection du lieu de synthèse de la molécule.

Le second niveau de compartimentation provient de l'adressage des PDEs. La compartimentation des PDEs est responsable de la génération de microdomaines d'AMPc, même loin de la zone de production (Terrin et al., 2006). Ainsi, l'AMPc diffuse dans la cellule mais l'activation spécifique d'effecteurs de l'AMPc est réalisée grâce à la régulation par les PDEs localement. L'adressage des ACs et des PDEs peut être régulée de manière étroite par la A-kinase anchoring protein ou AKAPs. Les AKAPs ont été historiquement montrées comme liant principalement la PKA (Protein Kinase A) mais plus récemment, certaines AKAPs ont été montrées comme interagissant avec certaines ACs et PDEs (Piggott et al., 2008; Terrin et al., 2012). On sait par exemple qu'au niveau du centrosome, une structure clé pour la migration et le cycle cellulaire, le niveau d'AMPc est régulé de manière étroite par PDE4D3 et la PKA, qui sont ancrés à AKAP450 (Terrin et al., 2012).

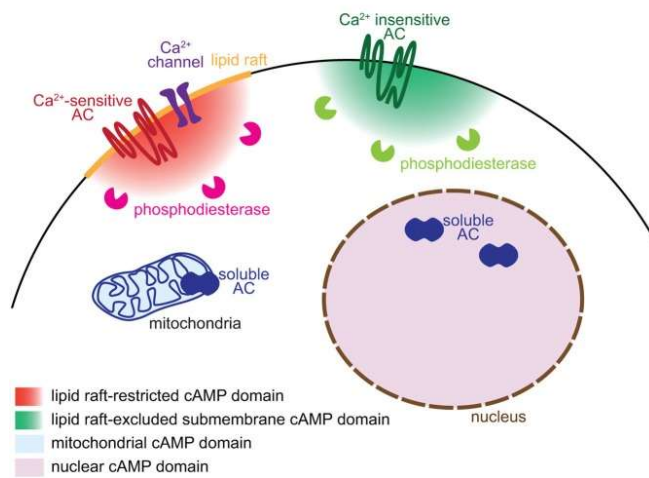


Figure 20 : Mécanismes de génération des domaines subcellulaires de l'AMPc.

Localisation subcellulaires différentes des adénylates cyclases et des phosphodiesterases permettant la génération de domaines subcellulaires d'AMPc. Les ACs transmembranaires sensibles au calcium sont restreintes aux rafts lipidiques (rouge) tandis que les ACs insensibles au calcium sont exclues des rafts lipidiques. Les ACs solubles synthétisent l'AMPc dans des endroits particuliers de la cellule comme le noyau et la mitochondrie. Les PDE dégradent

l'AMPc près de leur site de synthèse et limitent la diffusion du signal dans le reste de la cellule. (Averaimo and Nicol, 2014).

CONTEXTE

Le cil primaire est essentiel à la migration des interneurons du cerveau embryonnaire (Baudoin et al., 2012; Higginbotham et al., 2012). L'étude de C. Métin montre en particulier l'importance du cil primaire pour la réorientation de ces neurones de migration tangentielle à migration radiaire dans le cortex. Comme les neurones produits par la ZSV se réorientent de migration tangentielle à radiaire au niveau du BO, nous nous sommes intéressés, en collaboration avec C. Métin, au rôle du cil primaire dans ces neurones.

Pendant mon stage de M2, je me suis intéressé à la présence du cil primaire et à ses caractéristiques lors des différentes étapes de migration et de différenciation des neurones nouvellement générés par la ZSV adulte (Voir Figure 17). J'ai également observé sur tissu fixé que l'ablation du cil induisait un retard de migration chez ces neurones, ce qui m'a amené à développer la technique d'imagerie sur tranche aigüe de cerveau vivant contenant le CMR ainsi que leur tracking sur Image J. J'ai réalisé ces expériences de vidéomicroscopie à la fois sur cerveau adulte et post-natal et j'ai pu remarquer que les neurones en migration avaient une morphologie et un comportement de migration différent dans les deux systèmes. Dans la littérature, beaucoup considère que la migration des neurones du CMR post-natal est un modèle de la migration adulte. Je me suis donc intéressé **à la différence de comportement de migration des neurones du CMR entre le stade post-natal et le stade adulte et à un potentiel rôle différentiel du cil primaire dans les deux systèmes (Partie I).**

Parallèlement, une autre étudiante en thèse dans le laboratoire, Julie Stoufflet, a démarré une étude de la dynamique de l'AMPc dans les neurones en migration du CMR grâce à un biosenseur FRET AMPc spécifique, électroporé dans la souris post-natale (co-encadrement Isabelle Caillé/ Pierre Vincent). L'observation d'un hotspot d'AMPc dynamique au niveau du centrosome et donc à la base du cil nous a amenés à analyser le rôle du cil primaire dans ce contexte. Nous décrivons **un tout nouveau mécanisme de régulation de la migration neuronale impliquant une production ciliaire d'AMPc, agissant via la PKA au niveau du centrosome des neurones en migration (Partie II : article).** Dans cet article, mon travail s'est concentré sur la caractérisation du cil primaire dans les différentes lignées de souris (Figure 2B, 3A) et les expériences d'imagerie et d'analyse des neurones et de leur centrosome dans toutes les conditions présentées (Figures 4 et 5).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Lignées de souris

Les souris ont été élevées dans des cages contenant 2 femelles et un mâle avec un cycle jour/nuit de 12 heures. Les souris post-natales ont été gardées dans les cages avec leurs parents. Les souris utilisées proviennent d'un fond génétique C57bl6. Les lignées knockout conditionnels Kif3a (Kif3a^{flox/flox}, (Marszalek et al., 1999)) et Rpgrip11 (Rpgrip11^{flox/flox}, (Vierkotten et al., 2007)) ont été génotypées d'après les protocoles originels.

Plasmides et virus

Les plasmides pCaggs-GFP, pCaggs-CRE-IRES-GFP et pCaggs-CRE-IRES-Tdtomato ont été conçus dans le laboratoire. Le plasmide pCaggs-Epac-S^{H187} est un pCDNA3-Epac-S^{H187} (donné par Kees Jalink, (Klarenbeek et al., 2015)) avec quelques modifications mineures pour réduire la redondance. Le plasmide pCIG-PKA R1Δ2-6 wt subunit flagged (appelé pdn-PKA) a été fournis par Elisa Marti (Saade et al., 2017). Le plasmide pCs2-Centrin-RFP a été commandé sur addgene (#26753).

Tous les plasmides ont été utilisés à une concentration comprise entre 5 et 8μg/μL (0,01% Fastgreen) pour les électroporations post-natales, 2μg/μL (0,01% Fastgreen) pour les électroporations *in utero* et 10μg/μL pour les électroporations chez l'adulte.

Pour le marquage des neurones en migration à P30, nous avons utilisé un virus CMV-GFP pour marquer les cellules contrôles ou un virus Cre-IRES-Tomato pour induire l'ablation du cil primaire de manière spécifique. Les virus ont été utilisés dans le même cadre que précédemment (Daroles et al., 2016).

MiRNA

Le miR contre AC3 a été fabriqué avec le kit Invitrogen BLOCK-iTTM Pol II miR RNAi Expression Vector. Les oligos doubles brins ont été insérés dans un pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR. Nous avons utilisé le Invitrogen's RNAi Designer pour générer les oligos simple brin et augmenter l'efficacité de knockdown. Les séquences des oligos simples brins utilisés sont disponibles dans la section « *Materiel and methods* » du papier. Les deux différentes constructions ont été séquencées pour confirmer l'insertion correcte des oligos doubles brins. Pour produire le pcDNATM6.2-GW/Tdtomato-miR, la GFP a été retirée en utilisant les enzymes DraI et BamHI tandis que la tdTomato a été insérée à sa place.

L'efficacité des miRs a été validé par RT-qPCR sur des cellules NIH3T3. Les cellules ont été transfectées avec un plasmide exprimant AC3 et un miR Neg ou le miR-AC3. Quarante-huit heures de transfection après, les NIH3T3 ont été récoltées et les ARN ont été extraits.

Electroporation *in utero*

Des femelles C57Bl6 gestantes à E15 ont été anesthésiées avec de l'isoflurane. Durant la procédure, les souris ont été placées sur une plaque chauffée à 37°C pour maintenir leur température corporelle. Les cornes utérines ont été exposées et les embryons ont été injectés dans le ventricule cérébral latéral avec une micropipette en verre. 1µL de plasmide à 2µg/µL a été injectée. Les animaux injectés ont ensuite été électroporés avec 5 pulses de 45V durant 50ms espacés de 950ms en utilisant le CUY21 SC Electroporator et les électrodes de 5mm tweezer (CUI650-5 Nepagene). Les cornes utérines ont ensuite été replacées dans la femelle et des points de sutures ont été posés. Les animaux ont été placés dans une cage à 37°C pour récupérer leur température corporelle avant de retourner dans leurs propres cages.

Electroporations post-natales

Les électroporations post-natales ont été réalisées à P2. Les souris post-natales ont été anesthésiées par hypothermie. Des injections pseudo-stéréotaxiques ont été réalisées avec une micropipette en verre et les coordonnées suivantes ont été utilisées : à partir du Lambda ML : -1,2, A/P :2, D/V : 2,5-2. Pour chaque injection, 2µL de plasmide a été injecté dans le ventricule droit. Les animaux injectés ont ensuite été électroporés avec 5 pulses de 99,99V durant 50ms espacés de 950ms en utilisant le CUY21 SC Electroporator et les électrodes de 10mm tweezer (CUI650-10). Les animaux ont été placés sur une plaque à 37°C pour restaurer leur température corporelle avant de retourner auprès de leur mère. Les nouveau-nés ont été considérés comme aptes lorsque les petits bougent de manière naturelle et que leur couleur de peau est revenue au rose.

Electroporations adultes

Les souris C57Bl6 P21 ont été anesthésiées avec un mélange de kétamine et de xylazine. Les injections stéréotaxiques ont été réalisées avec une micropipette en verre et les coordonnées suivantes ont été utilisées : à partir du bregma M/L : 1, A/P :0, D/V :2,1. Pour chaque injection, 2 µl de plasmide à 10µg/µL a été injecté dans le ventricule droit. Les animaux ont été retirés des cadres stéréotaxiques et électroporés avec 5 pulses de 200V durant

50ms espacés de 950ms en utilisant l'électroporateur NEPA21 et les électrodes de 10mm tweezer (CUY650-10). Les animaux ont ensuite été placés sur une plaque à 37°C pour restaurer leur température corporelle avant de retourner dans leur cage.

Injectons stéréotaxiques à P60

Les souris P60 ont été anesthésiées avec un mélange de kétamine/xylazine. L'animal a été placé sur un cadre stéréotaxique et maintenu avec des barres d'oreille. La peau de la tête a été incisée et l'os du crâne percé à l'aide d'une perceuse. Les injections stéréotaxiques ont été réalisées avec une micropipette en verre dans la ZSV avec les coordonnées suivantes : M/L : 1, A/P : 1, DV : 2,1. Les animaux ont ensuite été suturés et placés sur une plaque chauffante à 37°C pour restaurer leur température corporelle avant de retourner dans leur cage.

Préparation des tranches de cerveau

Les tranches de cerveaux à E18 ont été préparées comme suit. La mère gestante a été sacrifiée par dislocation cervicale et les embryons ont été extraits des cornes utérines pour être placés dans la solution de coupe froide. Les embryons ont été décapités et leur cerveau a été rapidement retiré du crâne. Des tranches de 300µm d'épaisseur ont été coupées dans une solution de coupe froide avec la composition suivante : 125mM NaCl, 0.4mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1.25mM NaH₂PO₄, 26mM NaHCO₃, 5mM sodium pyruvate, 20mM glucose et 1mM acide kynurenique, saturée avec 5% CO₂ et 95% O₂. Les tranches ont ensuite été incubées pendant 30 min dans cette solution à température ambiante puis placée dans la solution d'enregistrement (identique à la solution de coupe mais la concentration de Ca²⁺ est de 2mM et nous n'avons pas ajouté d'acide kynurenique) pendant au moins 30min à 32°C avant d'imager.

Les tranches de cerveaux de souris âgées de P6 à P10 ont été réalisées comme décrit précédemment (Castro et al. 2010). Les nouveau-nés ont été décapités et le cerveau a été retiré rapidement du crane. Des tranches sagittales de cerveaux de 250µm d'épaisseur ont été coupées avec un microtome VTI1200S (Leica). Les tranches ont été préparées dans une solution de coupe froide avec la même composition que celle décrite dans le paragraphe précédent. Le reste du protocole est identique.

Les tranches de cerveaux à P30 ont été préparées comme suit : les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale et le cerveau a été rapidement retiré du crâne. Des tranches sagittales de cerveaux de 200µm d'épaisseur ont été coupées avec un microtome VTI1200S

(Leica). Les tranches ont été préparées dans une solution de coupe avec la composition suivante : 130mM potassium gluconate, 15mM KCl, 2mM EGTA, 20mM HEPES, 25mM glucose, 1mM CaCl₂ and 6mM MgCl₂, supplémentée avec 0.05mM D-APV (304 mOsm, pH 7.4 après équilibration) et saturée avec 5% CO₂ et 95% O₂ (Quiquempoix et al., 2018). Les tranches ont ensuite été placées pendant 3 à 5min dans une seconde solution froide avec la composition suivante : 225mM D-mannitol, 2.5mM KCl, 1.25mM NaH₂PO₄, 25mM NaHCO₃, 25mM glucose, 1mM CaCl₂ et 6mM MgCl₂ (Quiquempoix et al., 2018) saturée avec 5% CO₂ et 95% O₂ avant d'être placées dans la solution d'enregistrement (décrite également au-dessus) à 32°C et saturée avec 5% CO₂ et 95% O₂ pendant au moins 30 min.

Vidéomicroscopie

Pour analyser la migration neuronale, des images ont été obtenues avec un microscope confocal inversé SP5D (Leica). Les stacks d'images avec un intervalle vertical de 3µm ont été pris toutes les 3min durant 2 à 3h avec un objectif 40X/N.A. 1,25 et un zoom optique de 1,5.

Les images de biosenseur ont été acquises avec un microscope multi photon droit SP5 MPII avec un objectif 25X/N.A. 0,95, un zoom optique de 4 et un détecteur hybride GaAsP. La longueur d'onde d'excitation a été réglée à 850nm pour activer la mTurquoise2 du biosenseur. Les deux longueurs d'ondes d'émission ont été acquises en même temps avec un filtre de 479+/-40 nm et 540+/-50 nm. Les stacks d'image avec un intervalle vertical de 2µm ont été pris toutes les minutes durant 1h. La présence de la TdTomato, suggérant la présence de la CRE recombinase ou du miRNA, a été testée avec une tête confocale, avant et après une heure d'acquisition pour détecter l'expression de la Tdtomato. Pour la centrin-RFP, les acquisitions FRET avec le multi photon ont été alternées avec les acquisitions de la RFP avec la tête confocale du microscope.

La température dans la chambre d'acquisition était maintenue à 32°C pour les échantillons embryonnaires et post-nataux ou à 25°C pour les échantillons adultes. Les coupes de cerveaux ont été continuellement perfusées avec la solution d'enregistrement chauffées et saturée avec 5% de CO₂ et 95% O₂.

Analyse de la migration

Les analyses ont été conduites à l'aide du logiciel ImageJ et de son plugin mTrackJ (Meijering et al. 2012). Le corps cellulaire et le centrosome de chaque cellule a été suivi

manuellement entre chaque point de temps durant toute la durée de l'acquisition. Pour les caractéristiques de migration neuronale, les calculs de la vitesse, du pourcentage de temps de pause, de la fréquence de translocation nucléaire et de la distance de translocation nucléaire ont été réalisées avec les coordonnées x, y, t du corps cellulaire de chaque cellule. Pour les défauts du centrosome, la vitesse du centrosome, la distance maximale noyau-centrosome et le couplage centrokinèse-nucléokinèse ont été calculés avec les coordonnées x, y, t du centrosome et du corps cellulaire de chaque cellule. Les cellules qui ne migraient pas ou qui ont été suivies moins de 30min ont été exclues de l'analyse.

Vitesse de migration :

$$vitesse = \sqrt{(x_{t+1} - x_t)^2 + (y_{t+1} - y_t)^2} \times 20$$

Temps de pause :

Pour analyser le pourcentage de temps de pause, un seuil de la distance de migration a été appliqué pour discriminer les temps de pause des temps de translocation nucléaire. Si la distance est égale ou supérieure à 6µm entre deux acquisitions, la cellule est considérée comme migrante. Si la distance de migration est inférieure à 6µm, la cellule est considérée comme en pause.

$$Temps\ de\ pause\ (\%) = \frac{Nombre\ de\ pas\ de\ temps\ en\ pause}{Nombre\ total\ de\ pas\ de\ temps - 1} \times 100$$

Distance de nucléokinèse :

La distance de nucléokinèse a été calculée comme la moyenne de la distance parcourue durant une nucléokinèse.

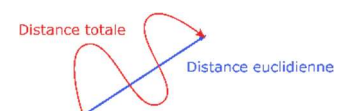
Fréquence de nucléokinèse :

$$Fréquence\ NK = \frac{Nombre\ de\ nucléokinèse}{Temps\ total}$$

Plusieurs pas de temps successifs durant lesquels la cellule migrera seront considérés comme une seule nucléokinèse.

Sinuosité

$$Index\ de\ sinuosité = \frac{\sqrt{(x_{final} - x_{initial})^2 + (y_{final} - y_{initial})^2}}{\sum_{initial}^{final} \sqrt{(x_{n+1} - x_n)^2 + (y_{n+1} - y_n)^2}}$$



Rétromigration :

$$\text{Rétromigration} = \frac{\text{nb de nucléokinèses dans le sens } \frac{BO}{ZSV}}{\text{nb de nucléokinèses total}}$$

Radar de migration :

La directionnalité de migration a été analysée en calculant l'angle entre le vecteur formé par la position initiale et la position finale de la cellule et le vecteur formé par le CMR au niveau de l'acquisition. Pour chaque cellule, nous avons calculé un vecteur de migration $\vec{v}_{y_n}^{(x_n)}$ à l'aide des coordonnées x et y initiales et finales où $\vec{v}_{y_n}^{(x_n)} = \frac{x_{final} - x_{initial}}{y_{final} - y_{initial}}$.

De la même manière, nous avons calculé un vecteur de migration pour le CMR $\vec{u}_{y_{CMR}}^{(x_{CMR})}$ de chaque acquisition afin de normaliser la direction de migration des cellules.

$$\theta = \cos^{-1} \frac{x_n \cdot x_{CMR} + y_n \cdot y_{CMR}}{\sqrt{x_n^2 + y_n^2} \cdot \sqrt{x_{CMR}^2 + y_{CMR}^2}}$$

Les valeurs sont exprimées en degrés et comprises entre 0° et 360°. Une cellule qui suivrait de manière parfaite la direction de migration au centre du CMR de la ZSV vers les BO aurait un angle de migration égal à 0°. Inversement, une cellule qui migrerait au centre du CMR vers la ZSV aurait un angle de migration égal à 180°.

Couplage centrokinèse-nucléokinèse :

Pour analyser la centrokinèse, un seuil a été appliqué pour discriminer les pauses des migrations du centrosome (centrokinèse). Si la distance entre le centrosome et le corps cellulaire augmente de 2 µm ou plus, le centrosome est considéré comme migrant. Si la variation de distance est inférieure, le centrosome est considéré en pause. A chaque nucléokinèse, nous avons regardé si une nucléokinèse y était associée. Si une centrokinèse est suivie d'une nucléokinèse, nous considérons que la centrokinèse et la nucléokinèse est couplée. Si une centrokinèse n'est pas suivie d'une nucléokinèse, nous considérons que la centrokinèse et la nucléokinèse n'est pas couplée.

$$\text{Couplage CK - NK (\%)} = \frac{\text{Nombre de CK - NK couplée}}{\text{Nombre total de CK}} \times 100$$

Distance N-C maximale :

La distance maximale entre le centrosome (C) et le noyau (N) de chaque nucléokinèse a été calculée.

Analyse des images avec le biosenseur

Les stacks d'images obtenus avec les émissions des fluorophores donneurs et accepteurs ont été analysés avec un code développé au laboratoire sur IGOR Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, Etats-Unis). L'intensité maximale pour chaque canal a été projetée sur l'axe vertical pour générer une image en 2D. Les intensités de fluorescence du donneur et de l'accepteur ont été utilisées pour générer un ratio pour rapporter le niveau d'activation du biosenseur pour chaque pixel.

Pour chaque neurone en migration, le ratio a été mesuré le long de sa direction de migration et calculé comme suit. Une série de points d'ancrage ont été positionnés manuellement le long de la cellule et le profil du ratio et de l'intensité ont été calculés le long de cette ligne sur une épaisseur de 1µm. Le profil d'intensité a été annoté manuellement avec l'arrière de la cellule, les bords du noyau et le bout du prolongement de migration.

La partie détaillée de cette analyse se trouvent dans la section « *matériel and methods* » de l'article.

Immunohistochimie

Des souris Kif3a^{lox/lox} P7-P10 ont été anesthésiées profondément avec de l'euthasol. Une perfusion intra cardiaque avec une solution 4% paraformaldéhyde/PBS1x a été réalisée pour fixer les tissus. Les cerveaux ont été récupérés et post-fixés sur la nuit dans la même solution de fixation. Les cerveaux ont été rincés trois fois avec une solution de PBS1x (gibco 1400-067). Des coupes sagittales flottantes de 50µm d'épaisseurs ont été réalisées avec un microtome VT1200S (Leica). Les coupes ont été incubées avec une solution de saturation (10% foetal bovine serum ; 0,5% Triton-X dans du PBS1x) durant une heure.

Les anticorps primaires utilisés sont : GFP (Aves, GFP-1020, 1/1000), PKAc (Cell Signaling Technology, #4782 1/250), AC3 (Santa Cruz, C-20 sc-588, 1/200), Arl13b (UC Davis/NIH NeuroMab Facility, 75-287, 1/1000), γ -tubulin (Sigma-Aldrich, T6557, 1/500).

Les coupes ont été incubées avec les anticorps dans la solution de saturation 48 à 72h à 4°C sous agitation. Les coupes sont ensuite rincées trois fois avec une solution de PBS1x.

Les anticorps secondaires utilisés sont: anti-chicken IgY alexa Fluor 488 (1/1000, Jackson ImmunoResearch: 703-545-155) contre un anti-GFP, anti-rabbit IgG Cy5 (1/1000, Jackson ImmunoResearch: 711-175-152) contre un anti-PKAc, anti-rabbit IgG Cy3 (1/2000, Jackson ImmunoResearch: 711-165-152) contre un anti-AC3, anti-Mouse IgG, Fc γ Subclass 1 specific alexa Fluor 594 (1/2000, Jackson ImmunoResearch: 115-585-205) contre un anti- γ -tubulin, anti-Mouse IgG, Fc γ subclass 2a specific alexa Fluor 647 (1/1000, Jackson ImmunoResearch: 115-605-206) contre un anti-Arl13b. Les coupes ont été incubées avec les anticorps secondaires dans la solution de saturation pendant 1h à température ambiante sous agitation. Les coupes ont été rincées trois fois avec une solution de PBS1x avant d'être contre colorée avec du Hoesch (1 μ l) et monté entre lame et lamelle avec du Mowiol.

Statistiques

Toutes les données recueillies sont analysées avec le logiciel R (version 3.5.1).

Les variables quantitatives sont analysées en utilisant des tests paramétriques (test de student pour la comparaison 2 groupes et l'analyse de la variance suivi de tests post hoc de Tukey HSD lorsqu'il y a plus de 2 groupes). Les variables ne satisfaisant pas aux conditions de validité des tests paramétriques (normalité de la distribution, égalité des variances) sont analysées avec des tests non paramétriques (test par Mann-Whitney pour la comparaison de 2 variables et par le test de Kruskal-Wallis suivi par un test post hoc de Nemenyi). Les variables qui satisfaisaient le test de normalité ont été analysées avec une one-way ANOVA suivie d'un test post hoc de Tukey pour les comparaisons multiples ou le test de Student pour les comparaison deux à deux. Les variables qualitatives ont été comparées en utilisant le test du Khi2 ou le test exact de Fischer.

L'analyse en composante principale (ACP) a été réalisée en utilisant toutes les variables analysées dans l'étude et les conditions expérimentales ont été incluses comme des variables supplémentaires.

PARTIE I – Différences de comportement de migration entre les stades post-natal et jeune adulte. Rôle différentiel du cil

L'ablation du cil primaire à P60 conduit à une hétérogénéité du phénotype de migration des neurones dans le CMR

Lors de mon M2 et au début de ma thèse, nous nous sommes intéressés au rôle du cil primaire dans la migration des neurones du BO chez la souris adulte (voir Figure 17). Pour cela, nous avons injecté dans la ZSV de souris adulte $Kif3a^{lox/lox}$ un virus GFP (conditions contrôles) ou un virus Cre-IRES-Tomato pour induire l'ablation du cil primaire dans les neurones en migration du CMR (groupe mutant). Des tranches sagittales aigües de cerveaux contenant le CMR ont été imagées au microscope confocal durant 3h à intervalles de 3 minutes. Nous avons analysé différents paramètres de migration (vitesse, vélocité, index de sinuosité, temps de pause, rétro migration, etc...). Puis une analyse en composante principale (ACP) a été utilisée pour analyser les résultats. Lorsque les ellipses de confiance de différentes populations se croisent, on peut conclure à une similitude de comportement. Dans le sens inverse, une absence de croisement signifie un comportement différent. Dans notre cas, les cellules Tomato positives dans le groupe mutant peuvent être catégorisées en deux populations distinctes (Figure 21, A, en noir et B, en rouge) dont les ellipses de confiance sont éloignées (Figure 21). Par ailleurs, la population B du groupe mutant semble se comporter comme les contrôles. Ceci traduit une différence statistique de comportement au sein du groupe mutant. Le groupe mutant est donc hétérogène et composée de deux sous-populations avec des caractéristiques très différentes. Par exemple, nous avons analysé notamment la vitesse de migration et trouvé que les cellules contrôles migraient avec une vitesse de $65,80 \pm 2,42 \mu\text{m/h}$ tandis que les cellules du groupe mutant avaient une vitesse de migration de $134,98 \pm 7,14 \mu\text{m/h}$ dans la population A du groupe mutant (valeur statistiquement supérieure à celle des cellules du groupe contrôle) et de $62,04 \pm 2,85$ dans la population B du groupe mutant (valeur statistiquement inférieure à celle des cellules du groupe contrôle).

Lorsque le virus Cre-IRES-Tomato est injecté dans la ZSV à P60, il peut être intégré dans les cellules de type A, B et C qui composent la ZSV. Cette hétérogénéité d'infection peut participer à l'hétérogénéité du phénotype. De plus, l'expression de la Tomato dans nos cellules ne garantit pas que la Cre a fonctionné et que l'ablation du cil a eu lieu dans les cellules dont nous avons analysé la migration. Il est donc également possible que la population de cellules mutantes soit constituées de cellules dans lesquelles l'ablation du cil a été réalisée et de cellules dans lesquelles l'ablation n'a pas encore été réalisée ou seulement partiellement.

Pour éviter ce problème, nous avons donc décidé de changer de technique. Nous avons injecté un virus exprimant soit la GFP (cellules contrôles) soit la Cre plus la Tomato (cellules

mutantes) dans le ventricule latéral de souris à P2 pour imagerie à P10 (souris post-natales) ou à P30 (souris « adultes »). L'avantage de cette technique est que seules les cellules contactant le ventricule à P2 sont marquées et qu'on obtient donc plus tard un contingent de cellules marquées homogènes dans le CMR. Du fait des contraintes de temps, je me suis limité à l'analyse de la migration à P10 et à P30.

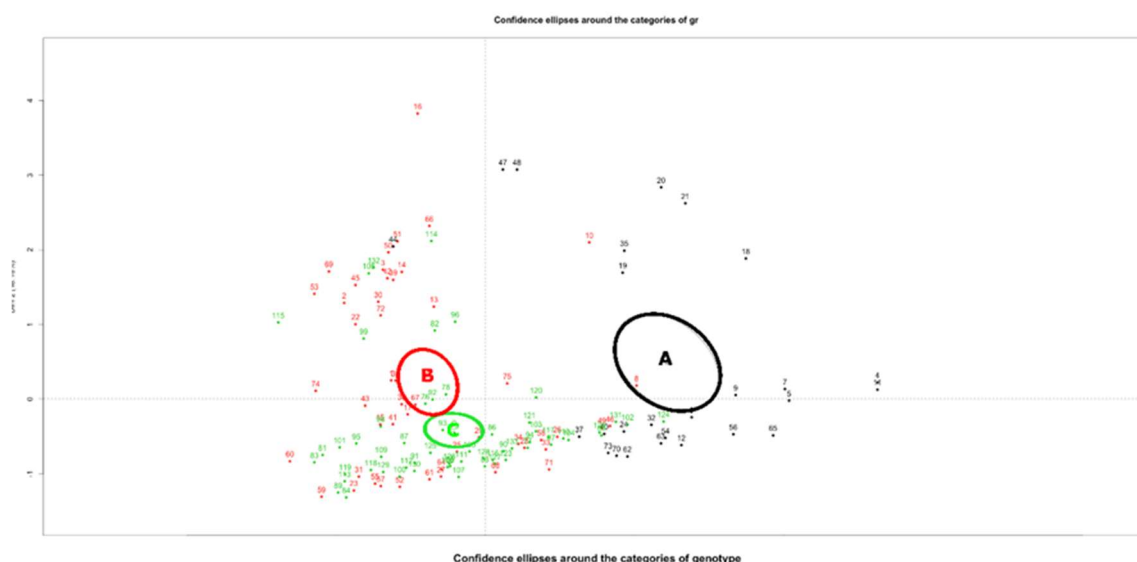


Figure 21 : Analyse en composante principale (ACP) à P60.

ACP réalisée avec les données de migration obtenues après injection des virus GFP ou Cre-Ires-Tomato dans la ZSV à P60. Les cellules contrôles ayant reçu le virus GFP (C) sont marquées en vert. Les cellules mutantes ayant reçu le virus Cre-Ires-Tomato (A et B) sont marquées en noir (A) et rouge (B). La population A se comporte différemment de la population B et C, similaire entre elles. La distance entre les ellipses de confiances traduit une différence statistique dans le comportement des différents groupes.

Les cellules en migration à P10 sont différentes morphologiquement des cellules en migration à P30

Nous nous sommes intéressés tout d'abord à la morphologie des neurones en migration à P10 et à P30 après injection de virus GFP ou Cre-Tomato à P2 comme décrit ci-dessus (Figure 22A).

Nous avons d'abord mesuré la taille et la complexité du prolongement de migration. A P10, le prolongement de migration des neurones dans le CMR mesure $26,59 \pm 1,62 \mu\text{m}$ (Figure 22A gauche et 22B). Le prolongement de migration des neurones à P30 est significativement plus grand avec une longueur de $36,00 \pm 2,36 \mu\text{m}$ (Figure 22A droite et 22B, P10 : N=3, n=48, P30 : N=2, n=38, test de Mann-Whitney, $p=0,002$).

Nous avons également étudié la complexité du prolongement de migration (Figure 22C). A P10 ou P30, le prolongement de migration est très majoritairement sans branchement.

Parfois, le prolongement de migration possède un branchement ou plus et cette observation est réalisée plus fréquemment à P10 qu'à P30 (97,36% à P30 contre 83,33% avec un seul prolongement à P10 ; P10 : N=3, n=48, P30 : N=2, n=38, Test de Fischer, $p=0,07$). Nos données suggèrent donc que le prolongement de migration a tendance à être moins complexe à P30 qu'à P10.

Durant leur migration dans le CMR, les neurones rassemblent un cil primaire à leur surface (cf Figure 17 et Figure 2B de l'article). Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à sa taille et à sa présence à différents âges. Pour cela, un marquage immunohistochimique contre Arl13b a été réalisé sur des coupes sagittales de cerveaux fixés de souris Kif3a^{lox/lox} à P10, P15, P20, P30 et P60. Arl13b est une petite GTPase localisée exclusivement dans le cil primaire (Kasahara et al., 2014). La taille du cil primaire dans tout le CMR a été analysé par comptage automatique après seuillage. On observe une augmentation progressive et significative de la taille du cil primaire au cours du développement post-natal. A P10, le cil primaire mesure $0,91 \pm 0,02 \mu\text{m}$, à P15 $1,04 \pm 0,03 \mu\text{m}$, à P20 $1,33 \pm 0,04 \mu\text{m}$, à P30 $1,39 \pm 0,1 \mu\text{m}$ et à P60 $1,39 \pm 0,05 \mu\text{m}$. (Figure 19D, P10 : N=1, n=1030, P15 : N=1, n=613, P20 : N=1, n= 537, P30 : N=3, n=85, P60 : N=2, n=349, ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey, $p<0,001$). La taille du cil primaire varie donc avec l'âge de l'animal, alors même que l'âge de la cellule dans le CMR est à peu près constant. Le cil primaire est un organite dynamique dont la taille est extrêmement régulée (Broekhuis et al., 2013). La littérature et nos données suggèrent donc que la différence de taille pourrait refléter une différence de fonctionnalité entre P10 et P30.

Parallèlement, nous nous sommes intéressés à la présence du cil primaire à P10 et P30. Des immunomarquages contre Arl13b, pour le cil, et gamma tubuline, pour le centrosome, ont été réalisés sur tissu fixé. Un cil est considéré comme appartenant à une cellule si le centrosome auquel il est rattaché est identifié dans la cellule (comme dans la Figure 17). On observe une diminution progressive du pourcentage de cellules avec un cil primaire au cours du vieillissement de l'animal (Figure 22E). A P10, 68,3% des cellules possèdent un cil primaire observable. A P30, seulement 34,4 % des cellules ont un cil primaire (P10, $n=48$, P30, $n=38$, test du Khi2, $p=0,003$). Ce pourcentage est similaire à celui que nous avons observé chez des souris P60 (Voir Figure 17). Ces résultats suggèrent soit que les neurones en

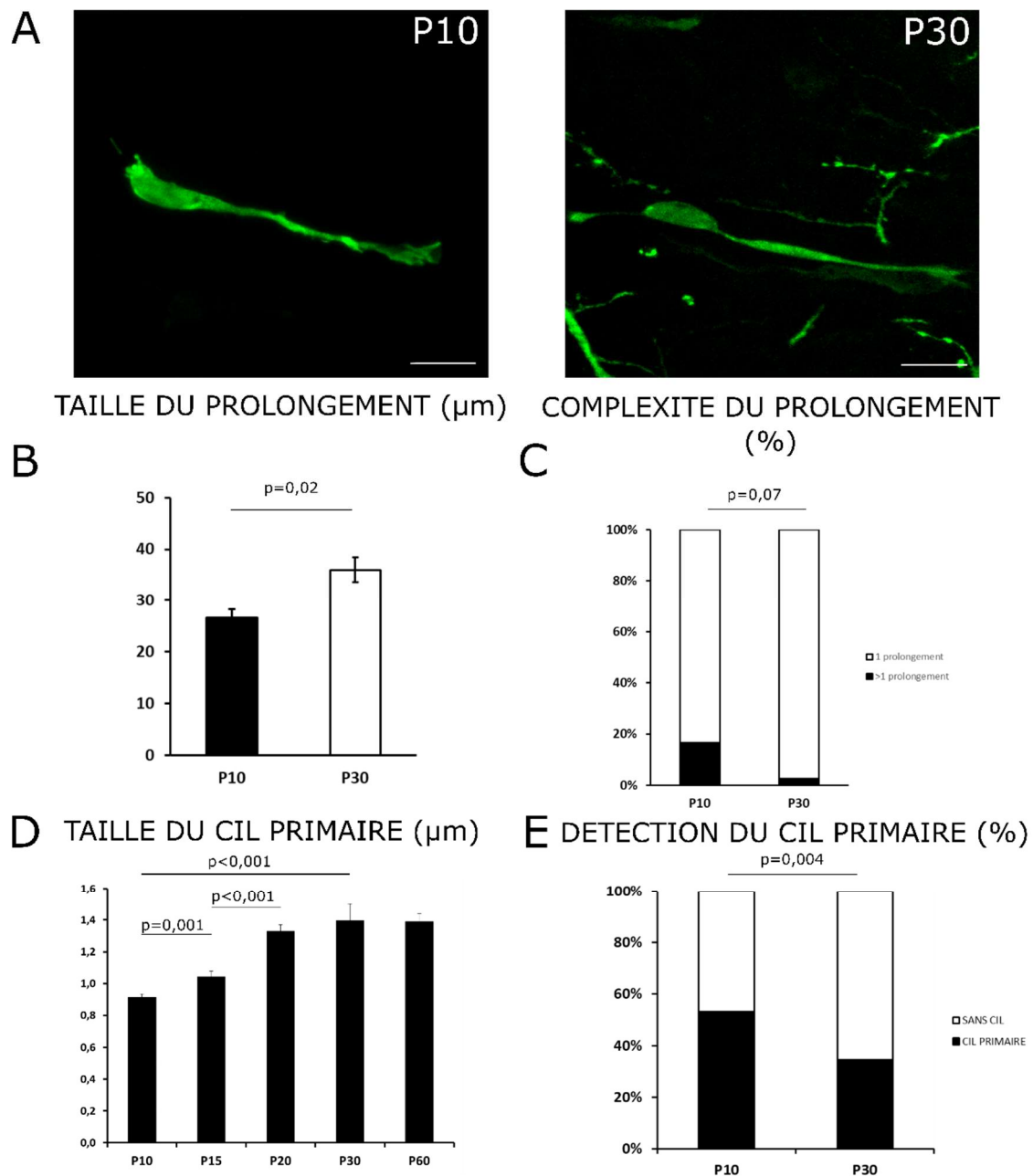


Figure 22 : Les neurones en migration dans le CMR possèdent des caractéristiques morphologiques différentes au cours du développement post-natal

(A) Neurone en migration dans le CMR à P10 (gauche) ou P30 (droite). (B) Taille du prolongement de migration en μm . Test de Mann-Whitney, $p=0,002$, (P10 : N=3, n=48, P30 : N=2, n=38). (C) Pourcentage de cellules avec un ou plusieurs prolongements de migration. Test de Fischer, $p=0,07$, (P10, N=3, n=48, P30, N=3, n=38). (D) Taille du cil primaire en μm . ANOVA suivi d'un test post-hoc Tuckey, (P10, N=2, n=1030, P15, N=1, n=613, P20, N=1, n=537, P30, N=2, n=85, P60, N=3, n=349). (E) Pourcentage de cellules avec un cil primaire détectable. Test du Khi2, $p=0,004$ (P10, N=3, n=109, P30, N=2, n=38).

migration à P10 assemblent plus souvent un cil soit que ce cil présente une dynamique différente, ce qui pourrait correspondre à une fonctionnalité différente.

Donc, l'ensemble des données montre que la morphologie des cellules en migration dans le CMR varie entre P10 et P30 et que le cil primaire semble posséder lui aussi des caractéristiques différentes. Nous nous sommes donc demandé si ces différences reflétaient des différences de comportement migratoire et si le rôle du cil primaire pouvait différer selon l'âge des souris.

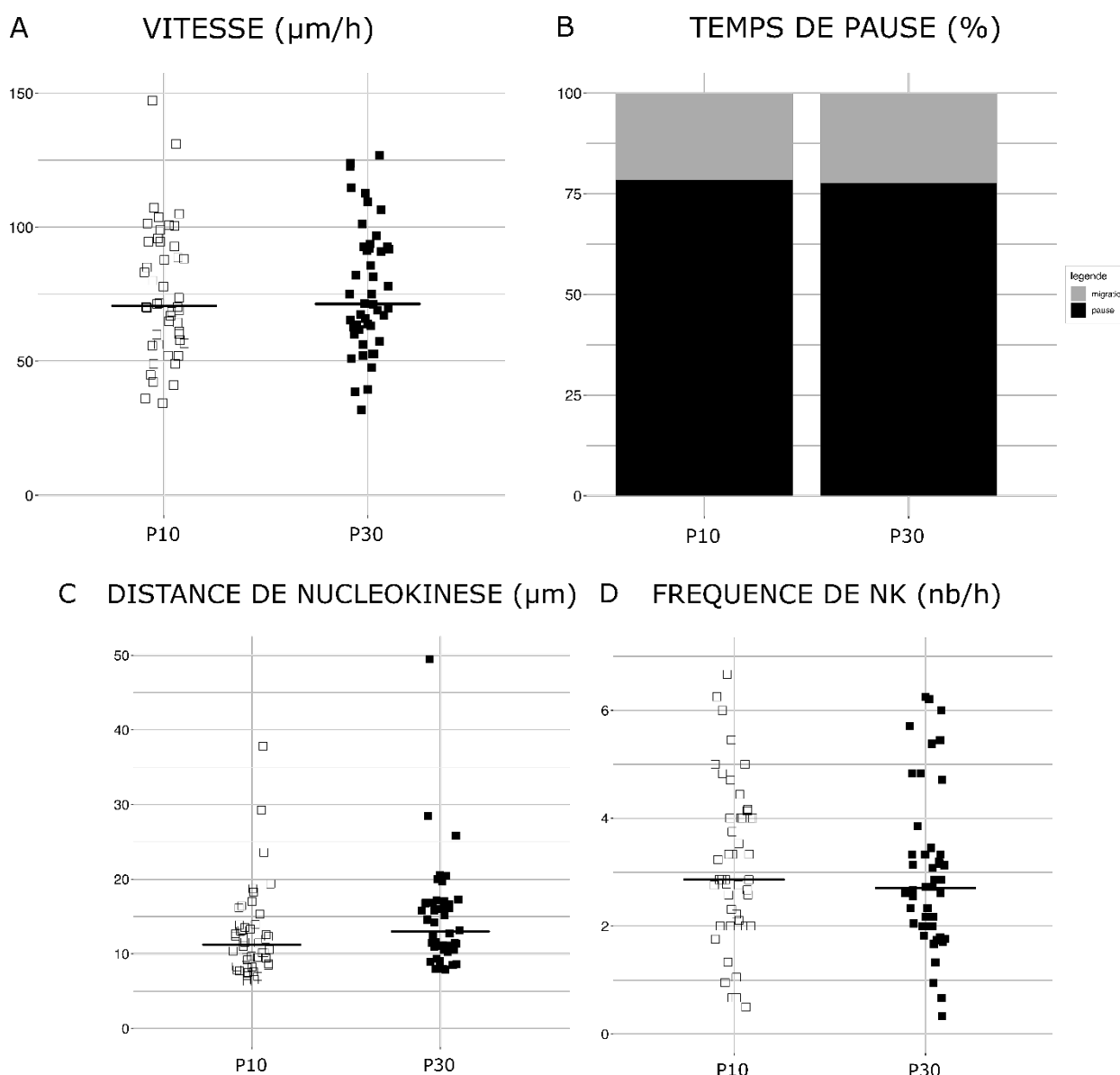


Figure 23 : Les paramètres de migration des neurones à P10 et P30 sont similaires

(A) Vitesse moyenne de migration des neurones. La ligne noire représente la médiane. ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey, $p < 0,001$, P10 : N=3, n=48, P30 : N=2, n=46. (B) Pourcentage de temps de pause des neurones en migration. P10 : N=3, $n_{\text{migration}}=236$, $n_{\text{pause}}=863$, P30 : N=2, $n_{\text{migration}}=146$, $n_{\text{pause}}=508$. (C) Distance moyenne de nucléokinèse. La ligne noire représente la médiane. ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey, $p < 0,001$, P10 : N=3, n=48, P30 : N=2, n=46. (D) Fréquence de nucléokinèse. La ligne noire représente la médiane. ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey, $p < 0,001$, P10 : N=3, n=48, P30 : N=2, n=46.

Les paramètres de migration (hors directionnalité) sont similaires entre les neurones en migration à P10 et à P30

Nous avons caractérisé la migration des neurones du CMR à P10 et à P30 (Figure 23). Des coupes aigües de CMR de souris Kif3a^{lox/lox} à P10 ou P30 contenant les cellules en migration ont été imagées avec un microscope confocal (films de 3h avec des intervalles de 3 minutes).

Nous avons analysé différents paramètres caractérisant la migration. Les neurones en migration à P10 et P30 migrent à la même vitesse moyenne (Figure 23A, $75,49 \pm 3,51 \mu\text{m/h}$ à P10 contre $76,98 \pm 3,52 \mu\text{m/h}$ à P30, ANOVA ($p < 0,001$) suivi d'un test post-hoc de Tukey, $p > 0,05$). Durant leur migration, ces neurones alternent entre des phases de pause et de migration que nous avons quantifiées. Nous n'avons pas relevé de différence significative dans le pourcentage de temps de pause entre les neurones à P10 et à P30 (Figure 23B, 78,5% de temps en pause à P10 contre 77,77% à P30, test du Khi2, $p > 0,05$).

Nous avons également analysé des paramètres de la nucléokinèse (NK) (Figure 23C, D). La distance et la fréquence de nucléokinèse ne sont pas modifiées entre P10 et P30 (Respectivement $12,47 \pm 0,86 \mu\text{m}$ à P10 contre $14,76 \pm 1,04$ à P30 et $3,15 \pm 0,21 \text{ NK/h}$ à P10 contre $2,99 \pm 0,22 \text{ NK/h}$ à P30, ANOVA ($p < 0,001$) suivi d'un test post-hoc de Tukey, $p > 0,05$). Ces résultats montrent que les neurones en migration à P10 et P30 migrent avec les mêmes caractéristiques de migration et de nucléokinèse.

Directionnalité de migration différente entre P10 et P30

Les jeunes neurones du CMR ont un comportement dynamique non linéaire durant leur migration (Martinez-Molina et al. 2011). Nous avons voulu savoir si les cellules avaient un comportement différent entre P10 et P30. Nous avons analysé la directionnalité de migration des cellules après marquage et acquisitions des cellules au confocal sur tranche de cerveaux aigües. Nous définissons la directionnalité de la migration comme la capacité d'un neurone à migrer directement vers le BO et la mesurons avec trois paramètres : l'index de sinuosité, la rétro-migration et l'orientation globale de la trajectoire de migration par un radar. L'index de sinuosité est le rapport de la distance totale sur la distance euclidienne de la trajectoire. Il est similaire à P10 ($1,21 \pm 0,02$) et P30 ($1,29 \pm 0,06$), ANOVA ($p < 0,001$) suivi d'un test post-hoc de Tukey, (Figure 24A). Classiquement, un neurone issu de la ZSV migre dans le CMR depuis la ZSV vers le BO. Parfois, on observe que le neurone migre dans la direction opposée (ou rétro-migration) c'est-à-dire vers la ZSV. Nous avons donc analysé le temps passé en rétro-migration (Figure 24B).

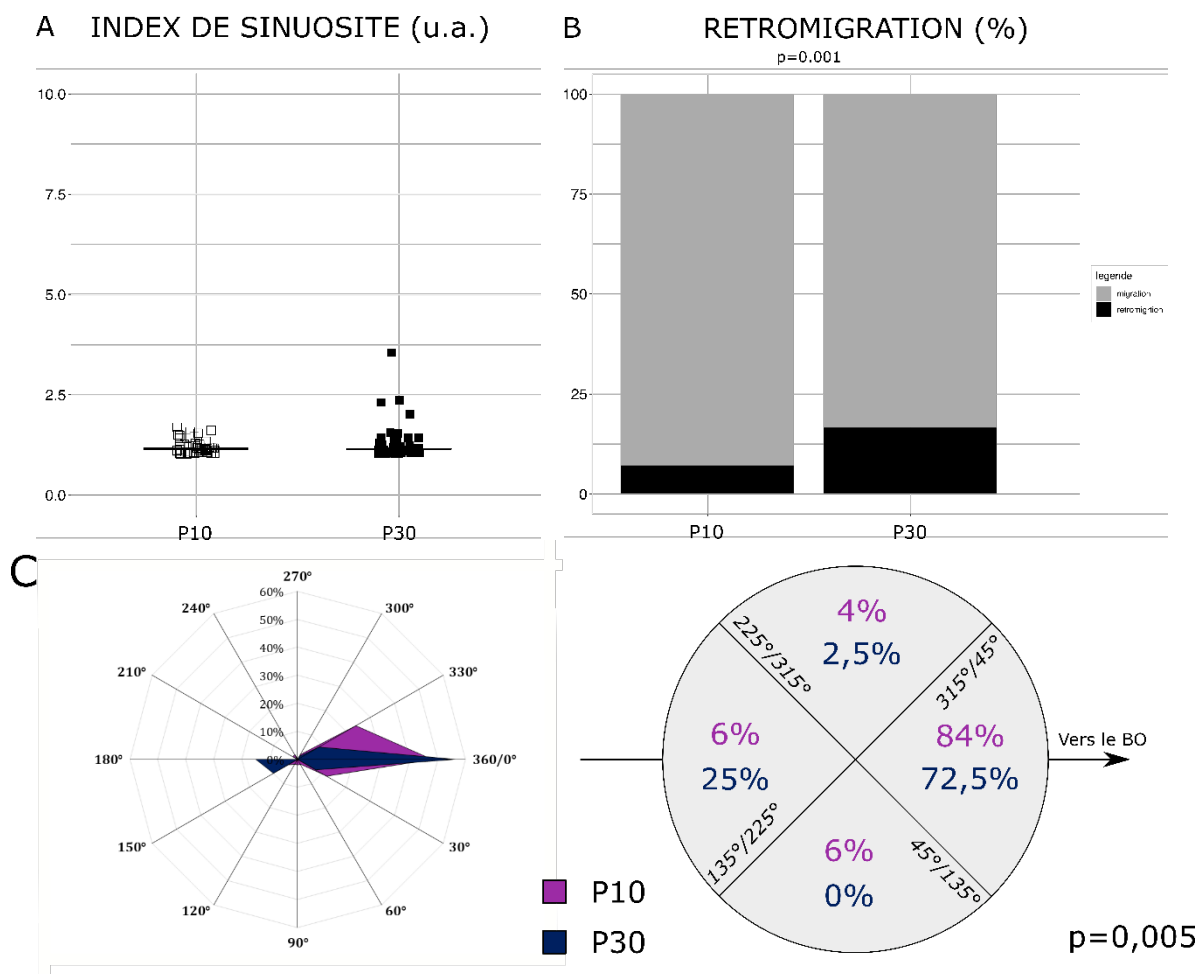


Figure 24 : La directionnalité de migration des neurones est modifiée entre P10 et P30

(A) Index de sinuosité. La ligne noire représente la médiane. ANOVA ($p < 0,001$) suivi d'un test post-hoc de Tukey, P10 : N=3, n=48, P30 : N=2, n=46. (B) Pourcentage de temps passé en rétro-migration. Test de Khi2, $p = 0,001$, P10 : N=3, n=222, P30 : N=2, n=296. (C) Radar de directionnalité. (Gauche) Radar de directionnalité de migration à 12 cadrans. (Droite) Radar de directionnalité de migration à 4 cadrans. Test du Khi2, $p = 0,005$, P10 : N=3, $n_{315^\circ-45^\circ} = 42$, $n_{45^\circ-135^\circ} = 3$, $n_{135^\circ-225^\circ} = 3$, $n_{225^\circ-315^\circ} = 2$, P30 : N=2, $n_{315^\circ-45^\circ} = 58$, $n_{45^\circ-135^\circ} = 0$, $n_{135^\circ-225^\circ} = 20$, $n_{225^\circ-315^\circ} = 2$.

A P10, les cellules passent 6% de temps en rétro-migration tandis qu'à P30, les neurones passent 25% de temps en rétro-migration (Test du Khi2, $P = 0,001$).

L'analyse de la position finale par rapport à la position initiale permet d'établir un graphique « radar » indiquant l'angle de migration globalement adopté par la cellule. A P10, les neurones migrent très majoritairement vers le BO (Figure 24C, 84% vers l'avant, 10% vers les côtés et 6% vers l'arrière). De manière frappante, à P30, les neurones migrent significativement moins vers l'avant et plus vers l'arrière (72,5% vers l'avant, 2,5% vers les côtés et 25% vers l'arrière) suggérant ainsi une différence de directionnalité globale de migration entre P10 et P30 (Test de Fischer, $p = 0,005$). Les neurones à P30 ont plus

fréquemment une trajectoire orientée vers l'arrière, ce qui est cohérent avec la mesure du temps passé en rétro-migration ci-dessus. En revanche, les neurones à P10 ont tendance à s'écarter d'une trajectoire rectiligne vers le BO et à partir plus latéralement.

L'ensemble de ces données suggère que la directionnalité de migration des neurones est modifiée entre P10 et P30. Cette différence pourrait impliquer des mécanismes de guidage différents entre ces deux âges et/ou des différences de contraintes de migration induits par l'apparition des chaînes de migration vers P21 (Peretto et al., 2005)

L'ablation du cil primaire induit des effets différents sur les paramètres de migration des cellules du CMR à P10 et P30

Nous avons analysé le rôle du cil primaire à P10 et P30. Pour cela nous avons injecté un virus GFP ou un virus Cre-Ires-Tomato à P2 dans des souris $Kif3a^{lox/lox}$ puis analysé les mêmes paramètres de migration et de directionnalité à P10 et à P30.

L'efficacité d'ablation du cil a été vérifiée par immunohistochimie GFP/Arl13b/ γ Tub (contrôles) ou Tomato/Arl13b/ γ Tub. Le pourcentage de cellules avec un cil observable diminue significativement aux deux âges (Figure 25A, P10 : 53,21% de cellules avec un cil chez les contrôles, 25% chez les mutants, Test du Khi2 $p<0,001$, P30 : 34,38% chez les contrôles, 15,63% chez les mutants, Test du Khi2 $p=0,02$) (Figure 25A).

Effet de la délétion du cil à P10

Les cellules mutantes présentent une vitesse de migration diminuée par rapport aux contrôles (Figure 25B, $75,49\pm 3,51$ $\mu\text{m/h}$ chez les contrôles et $55,81\pm 2,77$ $\mu\text{m/h}$ chez les mutants, ANOVA ($p<0,001$) suivi d'un test post-hoc de Tukey ($p<0,001$)) et une augmentation du temps de pause (Figure 25C, 78,5% du temps en pause pour les cellules contrôles et 87,7% pour les cellules mutantes, test du Khi2 ($p<0,001$)). Les paramètres de nucléokinèse sont également perturbés. Une diminution de la distance de nucléokinèse a été observée (Figure 22D, $12,47\pm 0,86$ μm chez les cellules contrôles et $10,12\pm 0,5$ μm chez les cellules mutantes, ANOVA ($p<0,001$) suivi d'un test post-hoc de Tukey ($p=0,05$)) associé à une diminution de la fréquence de nucléokinèse (Figure 22E, respectivement $3,15\pm 0,21$ NK/h et $2,06\pm 0,20$ NK/h, ANOVA ($p<0,001$) suivi d'un test post-hoc de Tukey ($p=0,001$)). Ces résultats sont globalement ceux qui sont également présentés sur la Figure 4 de l'article de la partie II.

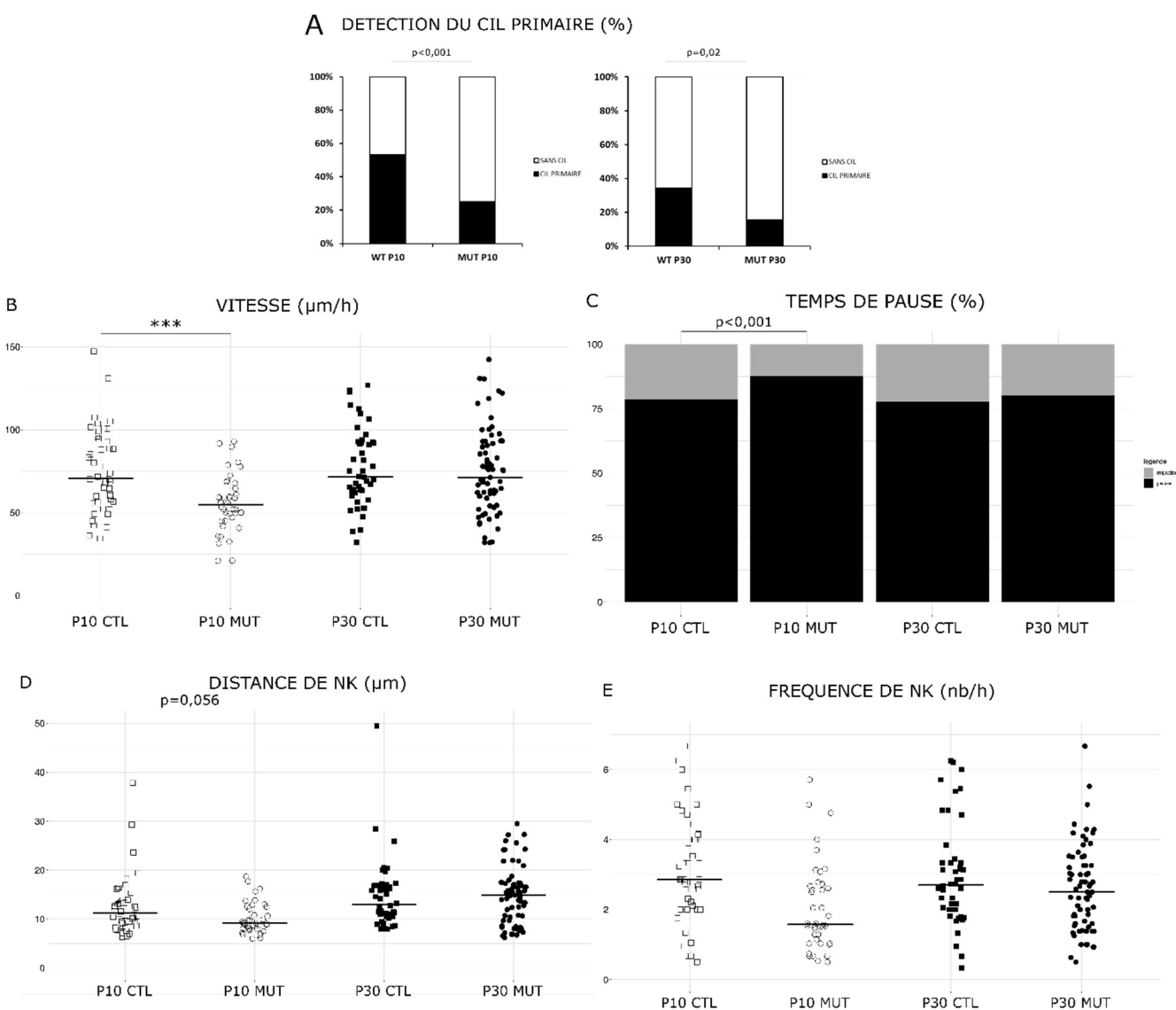


Figure 25 : L'ablation du cil primaire à P10 et P30 n'induit pas les mêmes défauts de migration et de nucléokinèse

(A) Pourcentage de cellules avec un cil primaire détectable à P10 (gauche) et P30 (droite) après injection de virus GFP (WT) ou Cre-Ires-Tomato (MUT), Test du Khi2 $p<0,001$ à P10 et $p=0,02$ à P30. (WT P10 : $N=3$, $n=109$, MUT P10 : $N=3$, $n=140$; WT P30 $N=3$, $n=32$, MUT P30 : $N=3$, $n=32$). (B) Vitesse moyenne de migration des neurones. La ligne noire représente la médiane. P10 WT : $N=3$, $n=48$, P10 MUT : $N=3$, $n=40$, P30 WT : $N=2$, $n=46$, P30 MUT : $N=3$, $n=71$. ANOVA ($p<0,001$) suivi d'un test post-hoc de Tukey. (C) Pourcentage de temps de pause des neurones en migration. P10 WT : $N=3$, $n_{\text{migration}}=236$, $n_{\text{pause}}=863$, P10 MUT : $N=3$, $n_{\text{migration}}=156$, $n_{\text{pause}}=1117$, P30 WT : $N=2$, $n_{\text{migration}}=146$, $n_{\text{pause}}=508$, P30 MUT : $N=3$, $n_{\text{migration}}=432$, $n_{\text{pause}}=1751$. Test du Khi2. (D) Distance moyenne de nucléokinèse. La ligne noire représente la médiane. P10 WT : $N=3$, $n=48$, P10 MUT : $N=3$, $n=40$, P30 WT : $N=2$, $n=46$, P30 MUT : $N=3$, $n=71$. ANOVA ($p<0,001$) suivi d'un test post-hoc de Tukey. (E) Fréquence de nucléokinèse. La ligne noire représente la médiane. P10 WT : $N=3$, $n=48$, P10 MUT : $N=3$, $n=40$, P30 WT : $N=2$, $n=46$, P30 MUT : $N=3$, $n=71$. ANOVA ($p<0,001$) suivi d'un test post-hoc de Tukey.

Effet de la délétion du cil à P30

L'ablation du cil primaire dans les neurones en migration du CMR à P30 conduit à des effets différents. Contrairement aux P10, la vitesse moyenne de migration est inchangée (Figure 25B, $76,98 \pm 3,52 \mu\text{m/h}$ chez les contrôles, et $74,74 \pm 3,01 \mu\text{m/h}$ chez les P30) ainsi que le temps de pause (Figure 25C, 77,77% de temps en pause pour les neurones contrôles et 80,2% de temps en pause pour les neurones mutants, Test du Khi2, $p > 0,05$). Nous avons également observé que les paramètres de nucléokinèse n'étaient pas modifiés (Figure 25D, E). Ni la distance de nucléokinèse ($14,76 \pm 1,04 \mu\text{m}$ chez les P30 contrôles et $14,67 \pm 0,69 \mu\text{m}$ chez les P30 mutants) ni la fréquence de nucléokinèse ($2,99 \pm 0,22 \text{ NK/h}$ dans les cellules contrôles et $2,64 \pm 0,16 \text{ NK/h}$ dans les cellules mutantes) ne sont perturbées. L'ablation du cil a donc un effet moindre sur la migration à P30 qu'à P10 : alors que le rythme de migration est profondément altéré par l'ablation du cil à P10, il n'est pas altéré par la mutation à P30. Ceci suggère donc un rôle différent du cil entre P10 et P30.

La directionnalité de migration est perturbée par l'ablation du cil primaire à P10 et à P30

Nous avons également analysé la directionnalité de migration à P10 et P30 consécutivement à l'ablation du cil primaire. La sinuosité est augmentée chez les P10 mutants et les P30 mutants en comparaison respective de leurs contrôles (Figure 26A, $1,21 \pm 0,03$ contrôles contre $1,84 \pm 0,2$ mutants à P10 et $1,29 \pm 0,07$ contrôles contre $2,04 \pm 0,18$ mutants à P30. ANOVA, $p < 0,001$, suivi d'un test post-hoc de Tukey, $p = 0,007$ et $p = 0,001$ respectivement). Le ratio $\frac{\text{valeur groupe mutant}}{\text{valeur groupe controle}}$ entre les deux âges ne semble pas être différent ($1,52$ à P10 et $1,58$ à P30).

La rétro-migration est également augmentée chez les cellules mutantes par rapport aux cellules contrôles à P10 et à P30 (Figure 26B, 7,11% contrôles contre 22,44% mutants chez les P10 et 16,62% contrôles contre 50,36% mutants chez les P30. Test du Khi2 $p < 0,001$ pour les deux comparaisons. Le ratio $\frac{\text{valeur groupe mutant}}{\text{valeur groupe controle}}$ entre les deux âges ne semble pas non plus être différent ($3,15$ à P10 et $3,03$ à P30). L'ablation du cil primaire à P10 et P30 induit les mêmes défauts de sinuosité de migration et de rétro-migration et dans des proportions similaires. Ceci suggère que le cil primaire pourrait jouer un rôle similaire dans le guidage vers le BO à P10 et P30.

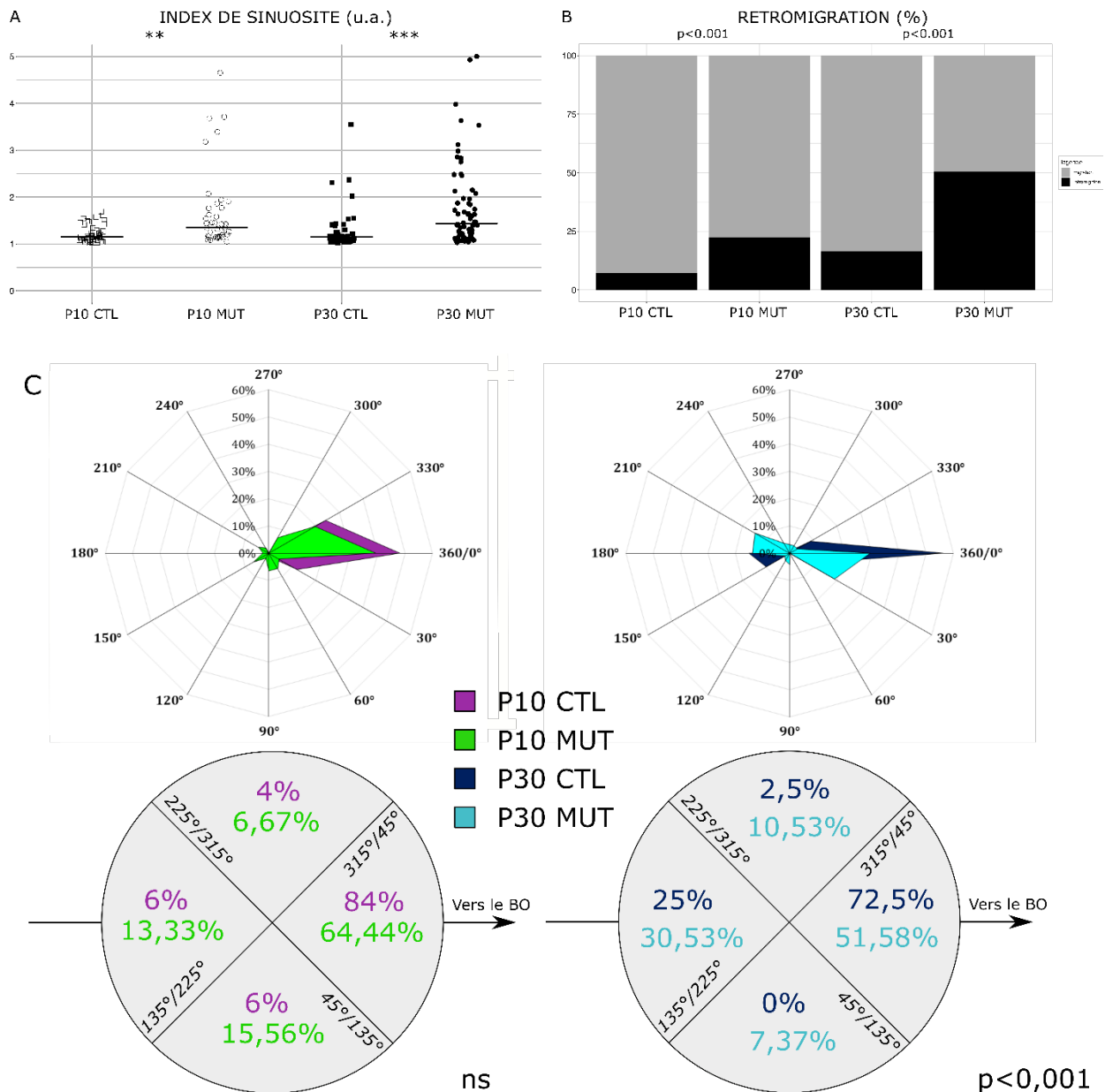


Figure 26 : L'ablation du cil primaire à P30 provoque un phénotype de directionnalité aggravé par rapport à P10.

(A) Index de sinuosité. La ligne noire représente la médiane. P10 WT : N=3, n=48, P10 MUT : N=3, n=40, P30 WT : N=2, n=46, P30 MUT : N=3, n=71. ANOVA ($p < 0,001$) suivi d'un test post-hoc de Tukey (B) Pourcentage de rétro-migration des neurones. P10 CTL : N=3, $n_{\text{migration}}=222$, $n_{\text{retromigration}}=17$, P10 MUT : N=3, $n_{\text{migration}}=121$, $n_{\text{retromigration}}=35$, P30 CTL : N=2, $n_{\text{migration}}=296$, $n_{\text{retromigration}}=59$, P30 MUT : N=3, $n_{\text{migration}}=206$, $n_{\text{retromigration}}=209$. (C) Radar de directionnalité. (Haut) Radar de directionnalité de migration à 12 cadrans. (Bas) Radar de directionnalité de migration à 4 cadrans. P10 CTL : N=3, $n_{315^\circ-45^\circ}=42$, $n_{45^\circ-135^\circ}=3$, $n_{135^\circ-225^\circ}=3$, $n_{225^\circ-315^\circ}=2$, P10 MUT : N=3, $n_{315^\circ-45^\circ}=29$, $n_{45^\circ-135^\circ}=7$, $n_{135^\circ-225^\circ}=6$, $n_{225^\circ-315^\circ}=3$, P30 CTL : N=2, $n_{315^\circ-45^\circ}=58$, $n_{45^\circ-135^\circ}=0$, $n_{135^\circ-225^\circ}=20$, $n_{225^\circ-315^\circ}=2$, P30 MUT : N=2, $n_{315^\circ-45^\circ}=49$, $n_{45^\circ-135^\circ}=7$, $n_{135^\circ-225^\circ}=29$, $n_{225^\circ-315^\circ}=10$.

Concernant la directionnalité globale mesurée avec le graphique radar (Figure 26C), il n'y a pas de différence à P10 entre les cellules contrôles et les cellules mutantes. Les cellules migrent dans la même direction occupant de la même manière les différents axes de migration possibles (P10 contrôles : 84% vers l'avant, 10% vers les côtés et 6% vers l'arrière ; P10 mutants : 64,44% vers l'avant, 22,23% vers les côtés et 13,33% vers l'arrière, test de Khi2, $p>0,05$). De manière intéressante, il existe en revanche une différence dans les radars de migration à P30 avec un comportement plus dispersé pour les cellules mutantes (P30 contrôles : 72,5% vers l'avant, 2,5% vers les côtés et 25% vers l'arrière ; P30 mutants : 51,58% vers l'avant, 17,90% vers les côtés et 30,53% vers l'arrière, test de Khi2, $p<0,001$). Nos analyses montrent donc que l'ablation du cil primaire induit un comportement de migration plus erratique avec une sévérité du phénotype plus importante à P30 qu'à P10.

Discussion partie I

Dans cette partie de ma thèse, l'analyse des comportements de migration à P10 et P30 a montré que la vitesse et les paramètres de NK sont similaires entre les deux âges. En revanche, les cellules présentent des paramètres de directionnalité différents avec une plus forte propension des cellules à P30 pour la migration vers l'arrière.

Par ailleurs, l'analyse des mutants ciliaires a montré que la délétion du cil produisait des effets différents à P10 et P30. A P10, elle affecte la vitesse et le rythme de NK et la directionnalité alors qu'à P30, elle affecte seulement les paramètres de directionnalité.

Méthodologie

Ces résultats restent préliminaires puisqu'ils concernent un nombre relativement faible d'animaux. La caractérisation morphologique et les données de migration obtenues à P30 ont été obtenues à partir d'un nombre faible d'animaux (N=2 pour les groupes contrôle et mutants à P30). Nous souhaitons donc analyser un plus grand nombre de souris. Nous avons également montré que le cil primaire jouait un rôle différentiel dans la migration neuronale entre P10 et P30. Nous avons utilisé la lignée $Kif3a^{lox/lox}$ pour réaliser cette étude. Pour valider le fait qu'il s'agit bien de phénotypes directement liés à la disparition du cil, il faudrait réaliser les mêmes expériences avec la lignée $Rpgrip11^{lox/lox}$, une autre lignée dans laquelle il est possible d'induire génétiquement l'ablation du cil primaire (voir partie II).

Nous avons analysé la migration à P30 du fait de contraintes de temps et en considérant qu'elle pouvait refléter la migration adulte puisque les chaînes se forment dans la 3ème semaine de vie. On peut donc se demander si le comportement de migration à P30 reflète celui de "vrais" adultes à P60. L'analyse préliminaire d'une seule souris à P60 (injection de virus à P2, analyse à P60, n= 58 cellules) suggère que ce n'est pas le cas car la vitesse de migration semble diminuée par rapport à P30 ainsi que les paramètres de NK. Ceci suggère que les changements postnataux affectant la migration ne sont pas entièrement établis à P30 et que pour vraiment parler de migration adulte, il nous faudrait analyser la migration plus tardivement.

Neurones sauvages P10 versus P30

Les neurones à P10 migrent de manière globalement similaire à ceux de P30 excepté en ce qui concerne les choix de direction. De manière étonnante, il semble donc que les changements environnementaux profonds dans les 3 premières semaines de vie que

constituent la fermeture du ventricule olfactif, le rétrécissement du CMR et la formation de chaînes n'influent pas sur les paramètres de vitesse et rythme de migration tels que mesurés. De plus, nous avons observé que les neurones à P30 avaient une morphologie différente avec un prolongement de migration moins branché et plus long qu'à P10. Ces différences morphologiques ne semblent donc pas affecter non plus la vitesse de migration ou les paramètres de NK.

Etant donné que la seule différence entre les deux âges concerne les choix de direction, il est probable que les changements environnementaux et en particulier la formation des chaînes aient une influence déterminante sur ces choix sans affecter la vitesse ou les paramètres de NK. L'importance de l'environnement dans la directionnalité des neurones a été mise en évidence sur les interneurones embryonnaires (Leclech et al., 2019). Dans cette étude *in vitro*, la modification des contraintes spatiales par les expérimentateurs conduit à l'établissement de différentes morphologies (branché ou non) et des états migratoires différents (migration déterminée ou erratique). Dans notre étude, la présence d'espaces intercellulaires présents à P30 (voir Figure 7) pourrait donner plus de liberté aux cellules au sein des chaînes et leur donner de l'espace pour faire des demi-tours. Dans le même temps, la mise en place des tubes astrocytaires autour des chaînes de neurones pourrait également réduire les degrés de libertés accordés aux cellules pour se déplacer entre les chaînes. Les tubes empêcheraient les cellules de migrer perpendiculairement au courant de migration rostral, leur laissant l'unique possibilité de migrer vers l'avant ou l'arrière chez l'adulte.

Pour tester l'hypothèse de l'influence de l'environnement sur la migration ou l'hypothèse d'un comportement autonome cellulaire, il faudrait réaliser des greffes hétérochroniques. Il s'agit de réaliser des greffes de cellules en migration dans le CMR de souris P10 dans des souris P30 et inversement.

Présence du cil à P10 et P30

La différence de pourcentage de cellules avec un cil observable ainsi que l'augmentation progressive de la taille du cil au cours du développement post-natal suggèrent que le cil primaire posséderait une dynamique différente en fonction de l'âge de l'animal. Deux articles ont analysé le rôle du cil primaire dans la migration des interneurones corticaux embryonnaires (Baudoin et al., 2012; Higginbotham et al., 2012). L'équipe d'Eva Anton a notamment montré en imageant le cil avec une construction Smoothed-Tomato que le comportement de migration des interneurones était corrélé avec des changements de taille et de mouvement du cil primaire. Celle de Christine Métin suggère à partir de résultats de

microscopie électronique que le cil primaire disparaît lors des phases de pause de la NK. Nos données peuvent donc laisser penser que le cil primaire montre une dynamique différente à P10 et P30 qui le rendrait plus fréquemment observable sur tissu fixé à P10. Cela pourrait provenir d'une plus grande stabilité au cours du cycle de migration. Pour vérifier cela, il faudrait réaliser une étude en vidéomicroscopie de la dynamique du cil primaire au cours de la migration avec par exemple un plasmide Arl13b-GFP permettant de marquer le cil primaire.

Il est à noter qu'en analysant la présence du cil de 39 neurones GFP positifs d'une souris P60 de la même manière qu'en Figure 25, on voit que ce pourcentage de cellule avec cil observable continue à diminuer (12,8%) (rendant l'analyse de la proportion de cellule avec ablation du cil en conditions mutantes quasi impossible...) alors que la longueur du cil semble rester constante.

Remarque : ce pourcentage est différent de celui rapporté à la Figure 17 pour mes résultats de M2 probablement car il ne s'agit pas du même fond génétique (Swiss pour le M2, lignée Kif3a sur fond C57Bl6J pour la thèse).

Neurones mutants P10 versus P30 : problèmes de directionnalité

L'ablation du cil a de forts effets sur la vitesse et le rythme de migration à P10 mais n'en a pas à P30. Nous discuterons cela en liaison avec les résultats concernant le hotspot d'AMPc dans la discussion finale. Cette partie concerne donc uniquement l'effet de l'ablation du cil sur la directionnalité.

L'ablation du cil affecte la directionnalité des neurones à P10 et à P30 ce qui pourrait s'interpréter comme une altération du guidage. Cet effet est similaire à l'augmentation de la sinuosité observée après ablation du cil dans les interneurones corticaux embryonnaires (Baudoin et al., 2012). Dans cet article, l'équipe de C. Métin se focalise sur l'action de Shh sur le cil des neurones embryonnaires en migration et révèle son rôle dans leur réorientation de migration tangentielle vers radiaire. Un article (Angot et al., 2008) rapporte un rôle chemoattracteur de Shh sur la migration des neurones issus de la ZSV adulte: Shh est exprimé au niveau du ventricule et freinerait la sortie des neurones de la ZSV. Nous nous sommes donc posé la question de savoir si les neurones du CMR P10 et P30 étaient sensibles à Shh. Pour cela, nous avons utilisé des souris rapportrices de l'activité Shh, les souris GliBS-GFP (Balaskas et al., 2012). Dans ces souris, une signalisation Shh active entraîne la présence de GFP dans les cellules. Nous avons observé que l'immense majorité des cellules du CMR à

P10 et P60 étaient GFP négatives (Figure 27). Il paraît donc peu probable que les défauts de guidage observés dans les mutants ciliaires résultent d'un défaut de signalisation Shh.

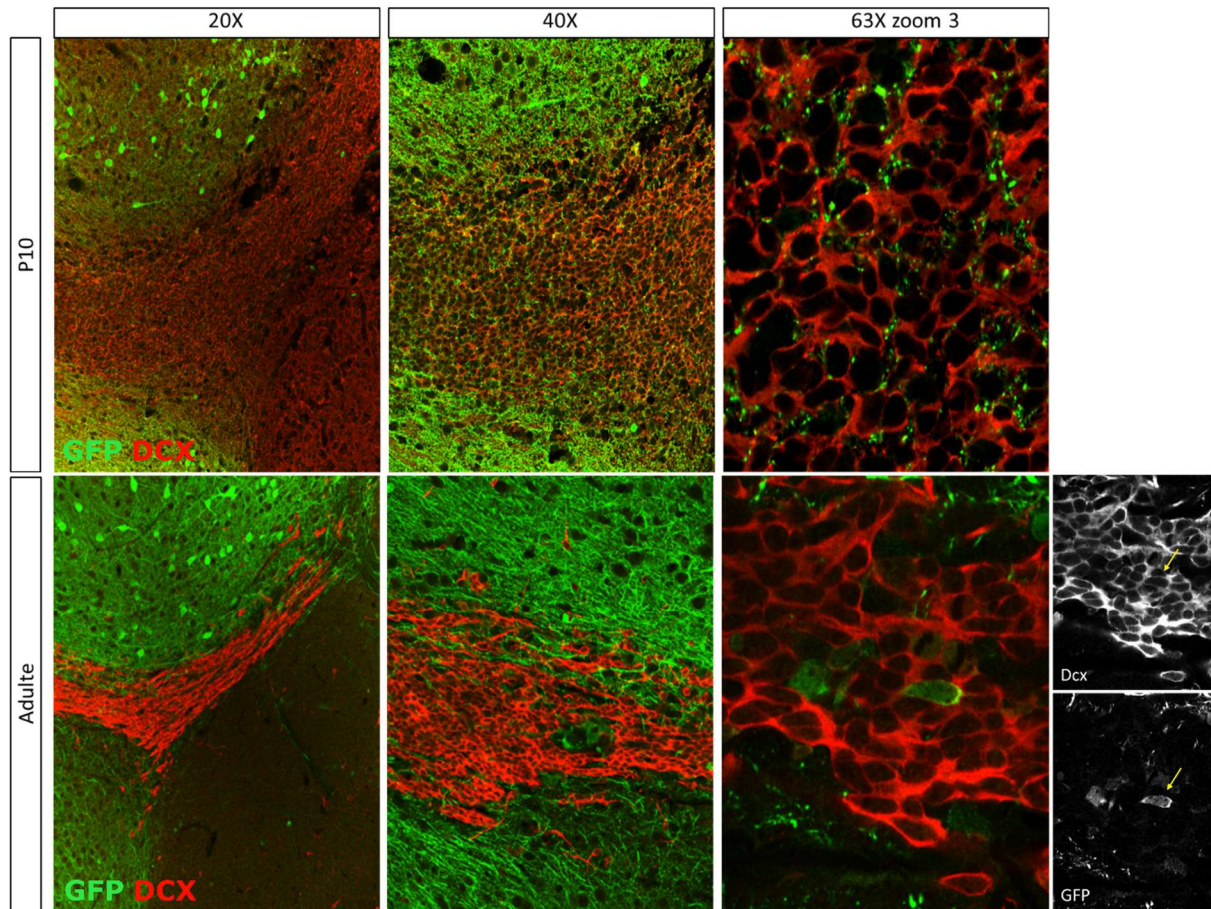


Figure 27 : La voie Shh n'est pas activée dans les neurones du CMR à P10 et P60

Immunomarquage contre la GFP (Vert) et DCX (Rouge) sur coupes sagittales de CMR à P10 (haut) et chez l'adulte (bas) dans la lignée GliBS:GFP. (Haut) A P10, le CMR est large et les neurones qui migrent ne forment pas de chaînes. Aucune cellule DCX positive n'est GFP positive montrant que la voie Shh n'est pas activée dans les neurones du CMR à P10. Les structures GFP positives ressemblent à des varicosités axonales. (Bas) Chez l'adulte, le CMR est plus fin et les neurones migrent en chaînes. L'immense majorité des cellules DCX sont GFP négatives. Exceptionnellement, on peut voir un neurone doublement marqué (encart à droite, flèche).

On pourrait donc suspecter l'implication d'autres molécules de guidage. SLIT1 et 2 pourraient être de bons candidats. Ce sont des facteurs chémo-répulsifs sécrétés par le plexus choroïde dans les ventricles qui repoussent les jeunes neurones de la ZSV vers le BO (Nguyen-Ba-Charvet et al., 2004; Sawamoto et al., 2006). Leurs récepteurs Robo1,2 et 3 sont exprimés par les jeunes neurones et sont présents dans le cil (Higginbotham et al., 2012) De plus, et de manière très intéressante par rapport à notre problématique, la chémo-répulsion induite par SLIT a un rôle essentiel dans la modulation de la polarité des neuroblastes du

CMR (Higginbotham et al., 2006). Dans ce contexte, on peut imaginer que la disruption de la signalisation Slit par ablation du cil pourrait être à l'origine du phénotype de directionnalité que nous observons chez les mutants à P10 et P30. Par ailleurs, on peut imaginer que le cil plus long à P30 ou chez l'adulte permettrait aux neurones d'être sensibles à de plus petites quantités de Slit après la fermeture du ventricule.

**PARTIE II – ARTICLE : Compartmentalized cAMP dynamics
regulates neuronal migration**

Compartmentalized cAMP dynamics regulates neuronal migration

Maxime Chaulet*, Julie Stoufflet*, Mohamed Doulazmi, Coralie Fouquet, Caroline Dubacq, Christine Métin, Alain Trembleau, Pierre Vincent and Isabelle Caillé

Introduction

3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) is traditionally considered as a long range-acting second messenger, freely diffusing in the whole cell. The development of genetically-encoded FRET (Förster Resonance Energy Transfer)-based biosensors has challenged this view by allowing real-time imaging of cAMP dynamics in living cells with high spatio-temporal resolution (Calebiro and Maiellaro, 2014; Lefkimmatis and Zaccolo, 2014). This revealed that cAMP signals are highly compartmentalized at the subcellular level and that this fine-tuned compartmentalization ensures the intracellular specificity of the pathway.

cAMP signaling plays fundamental roles in multiple steps of the nervous system development such as neuronal polarization (Shelly et al., 2010b), axon guidance (Nicol et al., 2006; Nishiyama et al., 2003) and synaptogenesis (Munno et al., 2003). Monitoring of cAMP signal in neurons with FRET-based biosensors unveiled its dynamic compartmentalization in microdomains of axons, dendrites or growth cones (Averaimo et al., 2016; Calebiro and Maiellaro, 2014; Maiellaro et al., 2016b). However, the dynamics of cAMP signaling has never been studied in migrating neurons.

Neuronal migration is a crucial step for the establishment of brain circuitry since all neurons have to migrate from their sites of birth to their final sites of integration. Dysfunction in neuronal migration leads to severe cortical malformations such as lissencephalies and periventricular or subcortical band heterotopia and might be involved in psychiatric disorders (Bertipaglia et al., 2018; Silva et al., 2019). Migrating neurons display a cyclic saltatory migration with alternations of somal translocation and pauses. For each somal translocation, nucleus and centrosome move forward in a "two-stroke" cycle, with the centrosome moving first within a swelling of the leading process (centrokinesis, CK) and the nucleus following subsequently (nucleokinesis, NK) (Bellion et al., 2005b; Belvindrah et al., 2017; Schaar and McConnell, 2005b). This nucleus to centrosome coupling involves local cytoskeleton remodeling and molecular motors activation. The cAMP dependent protein kinase A (PKA) is a highly compartmentalized protein of paramount importance for cellular migration in general (Bradshaw et al., 2011a; Howe, 2011) and neuronal migration in particular (Haase, 2003;

Toriyama et al., 2012). This led us to assess whether cAMP compartmentalization might dynamically participate in the spatio-temporal regulation of this two-step migration.

Our model for studying migration is the ventricular/subventricular zone (V/SVZ) to olfactory bulb (OB) migration in the postnatal mouse. Neurons produced in the V/SVZ migrate tangentially over a long distance in the Rostral Migratory Stream (RMS) (Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Lois et al., 1996b). Biphotonic imaging of migrating neurons electroporated with a FRET-based biosensor (Epac-S^{H187}) (Klarenbeek et al., 2015b) in acute slices of the RMS revealed a dynamic cAMP hotspot localized around the centrosome, present during NK and absent during pauses. Genetic ablation of the primary cilium as well as knock-down of the ciliary Adenylate Cyclase 3 (AC3) induced permanent disappearance of the hotspot, showing the importance of cAMP ciliary production for its formation. The hotspot disappearance led to a slowed-down migration with increased pausing phases and reduced frequency of NK. This was accompanied by defects in centrosome movement with reduced speed, decreased maximum distance from the nucleus and increased uncoupling of CK and NK. Moreover, genetic delocalization of the centrosomal PKA recapitulated this migratory phenotype, showing its importance as a downstream effector of the cAMP hotspot. Our data thus show that ciliary-produced cAMP forms a dynamic centrosomal hotspot, which locally acts on centrosomal PKA to regulate migration and efficient coupling of centrosome and nucleus. This compartmentalized cAMP dynamics is widely used in migrating neurons since we observed it in radially migrating postnatal OB interneurons, in adult RMS and in radially migrating embryonic neurons.

Results

cAMP dynamics in migrating neurons of the postnatal RMS: a transient centrosomal hotspot during NK

A massive amount of young neurons migrate from the postnatal V/SVZ to the OB in the RMS (Fig 1A) (Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Lois et al., 1996b). They migrate by alternations of pauses and NK (Fig 1A). We observed that they spend 80% of their time in pauses and perform in average 3.15 ± 0.21 NK per hour (see fig 4B).

To investigate cAMP dynamics in migrating neurons, we electroporated neonate mice with an intraventricularly-injected plasmid to express the FRET cAMP-specific biosensor Epac-S^{H187} (fig 1B and 1C). This recent biosensor displays high affinity for cAMP allowing detection of limited changes in cAMP concentrations with high dynamic range (Klarenbeek et al., 2015b).

Biosensor-expressing neurons were imaged in live acute sections of the RMS with a biphoton microscope (one-hour movies with one-minute intervals). Ratiometric analysis revealed that a cAMP-rich region (hereafter called hotspot) was transiently present during NK and disappeared during pauses (Fig 1D and movie 1). This hotspot specifically reflected a cAMP local enrichment since it was absent in neurons transfected with a version of Epac-S^{H187} with mutated cAMP binding site (movie 2).

Extensive analysis of migrating neurons (ie performing at least one NK during a one-hour movie) showed that 82% of them displayed such a dynamic hotspot (101 neurons performing 134 NK from 10 mice). A limited percentage of cells displayed several cAMP rich zones, usually two, which likely corresponded to the two centrioles (movie 3).

The hotspot stereotypically appeared at the front of the cell body before moving into the leading process, where it remained until after the nucleus performed a NK. It then disappeared during the following pause and could reappear later following the same pattern before the neuron undertook another NK.

As this movement resembled the classically described centrosome movement during saltatory migration, we co-electroporated the biosensor with centrin-RFP to label the centrosome (Fig 1E). We saw that the hotspot was present around the centrosome before its movement into the leading process and stayed around it during NK before disappearance during the pause.

Measurement of the ratiometric characteristics of the hotspot showed that its average diameter was of 965,4 nm $\pm$ 95,48nm. In addition, the maximum hotspot ratiometric intensity was constant during NK being in average 52% ($\pm$ 2%) higher than the mean cell intensity (n=12 cells with 16 NK).

Use of a sensitive cAMP biosensor with a high signal to noise ratio coupled with live biphoton imaging in slices thus allowed us to discover a dynamic cAMP hotspot at the centrosome of RMS migrating neurons.

Primary cilium is necessary for centrosomal hotspot formation

The primary cilium is a small rod-shaped organelle linked to the centrosome (fig 2A). It is present on most eukaryotic cells including neurons (Guemez-Gamboa et al., 2015). Its absence or dysfunction in ciliopathies lead to severe brain defects, suggesting its major importance for brain development (Guo et al., 2017b; Higginbotham et al., 2012b)

Immunostaining of GFP positive RMS migrating neurons with Arl13B, a small ciliary GTPase, coupled with γ -tubulin, marker of the centrosome, showed that they assemble a cilium during migration (Fig 1B). The primary cilium length was in average 910 $\pm$ 0,02 nm (N=1, n=1030)

The primary cilium was recently reported to be a cAMP-rich region by using a cilium-targeted cAMP biosensor (Moore et al., 2016b; Sherpa et al., 2019b). We thus wondered whether the cAMP hotspot that we observed at the centrosome could emanate from the primary cilium. To answer this question, we used two mouse lines in which deletion of the primary cilium could be genetically induced by cre recombination. Kif3a is part of a kinesin motor required for cilium maintenance (Rosenbaum and Witman, 2002b). Rpgrip1l (retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting protein 1 like) is a protein located at the basis of the primary cilium, whose mutation leads to ciliopathies in humans (Arts et al., 2007).

We performed Cre recombination of the floxed genes in migrating RMS neurons by injecting a Cre expressing virus coupled to the GFP into the ventricle of neonate Kif3alox/lox and RPGrip1llox/lox mice. This led to an efficient ablation of the primary cilium in both mouse lines. The percentage of GFP positive RMS neurons displaying a γ -tubulin positive centrosome associated with an Arl13B positive primary cilium was significantly reduced in Cre-injected Kif3alox/lox (25% in Cre versus 53,21% in GFP control animals, n=109 cells from 3 mice in GFP animals and n=140 cells from 3 animals in Cre animals) and Rpgrip1llox/lox mice (16.2% in Cre versus 47% in GFP control animals, n=68 cells from 2 mice in GFP animals and n=99 cells from 3 animals in Cre animals).

Cotransfection of the cAMP biosensor with Cre in neonate floxed mice showed that cilium disappearance led to a concomitant disappearance of the hotspot in both mouse lines (Fig 2C and D and movie 4 and 5). Whereas 82% of cells displayed a hotspot during NK in WT mice, this number was reduced to 30% in Cre-transfected Kif3alox/lox (36 cells of 46 NK in 4 mice) and to 20% in Cre-Transfected Rpgrip1l (52 cells of 73 NK in 7 mice) (Fig 2E). When cells displayed two successive NK, the phenotype of absence or presence of hotspot during NK was persistent. Moreover, the more efficient disappearance of the hotspot in Rpgrip1l mice is in line with the more efficient genetic ablation of the primary cilium, strongly suggesting that the primary cilium is necessary for formation of the hotspot.

Ciliary type 3 Adenylate Cyclase 3 (AC3) is necessary for centrosomal hotspot formation

AC3 is described as the predominant cAMP producer in neuronal primary cilium (Bishop et al., 2007). We thus assessed its presence in the primary cilium of RMS migrating neurons through immunocytochemistry (Fig 3A). We observed that more than 40% of Arl13B positive primary cilia in the RMS were also AC3 positive (n= 141 cells from 2 mice).

We thus produced an anti AC3 microRNA coupled to GFP to knock down AC3. Its efficiency was verified by qRTPCR on cells transfected with miRAC3 or a control miR and AC3 (Fig

3B). Transfection of the miRAC3 led to a 40% decrease of the overexpressed AC3 mRNA as compared to control miR suggesting the efficiency of the designed microRNA.

Co-electroporation of the MirAC3 with the biosensor showed that AC3 knock-down led to similar disappearance of the hotspot as primary cilium ablation (Fig 3C and movie 6). Only 22% (N=2, n=17cells) of MirAC3 transfected cells displayed a visible hotspot during NK.

This shows that the primary cilium produces the hotspot through AC3.

Migration defects in the absence of hotspot

Given the dynamics of the hotspot and its subcellular localization, we wondered whether it could regulate the dynamics of migration. We thus compared the migration of WT neurons with the migration of cilium-ablated and AC3 knocked-down neurons, in which the hotspot was absent. To this end, Kif3alox/lox neonate mice were intraventricularly transfected with GFP, Cre recombinase coupled with GFP or MirAC3 coupled with GFP. Live acute sections of the RMS were imaged with a confocal microscope (3-hr movies with 3-minute intervals). Tracking of the GFP positive cells showed that cilium ablation as well as AC3 knock-down significantly slowed down migration (GFP $75,49 \pm 3,48 \mu\text{m/h}$ versus $55,81 \pm 2,74 \mu\text{m/h}$ and $58,08 \pm 2,98 \mu\text{m/h}$ in CRE and MirAC3, $p < 0.001$, $n=3$ mice, Fig 4A, movie 7, 8 and 9). This was accompanied by an increased percentage of pausing time (76% in WT versus 87% and 84% in Cre and MirAC3, $p < 0.001$, $n=3$ mice, Fig 4B). Detailed analysis of the NK showed that the average frequency of NK reduced ($3,15 \pm 0,21 \text{ NK/h}$ in WT versus $2,06 \pm 0,20 \text{ NK/h}$ and $2,14 \pm 0,21 \text{ NK/h}$ in Cre and MirAC3 $p < 0.001$, $n=3$ mice, Fig 4C).

Given the centrosomal location of the hotspot, we wondered whether it could directly play a role in the dynamics of CK. To assess this question, we co-transfected centrin-RFP along with GFP, Cre coupled with GFP or MirAC3 coupled with GFP and co-tracked cell body and centrosome (movies). We defined a CK as an increase of the centrosome to nucleus distance of at least $2 \mu\text{m}$ followed by a decrease of at least $2 \mu\text{m}$. The maximum distance between nucleus and centrosome during CK was reduced in cilium-ablated and AC3 knocked-down neurons as compared to WT (GFP $12,32 \pm 0,42 \mu\text{m}$ versus $10,42 \pm 0,35 \mu\text{m}$ and $9,85 \pm 0,63 \mu\text{m}$ in CRE and MirAC3, $p < 0.001$, $n=3$ mice, Fig 4D). Additionally, we defined two types of CK: a CK followed by a NK was considered efficient whereas a CK not followed by a NK was considered inefficient. Interestingly, we saw an increase of the percentage of inefficient CK in cilium ablated and AC3 knocked-down neurons as compared to WT (26% in WT versus 43% and 37% in Cre and MirAC3, $p = 0.002$, $n=3$ mice, Fig 4E), which suggested that the hotspot was necessary for proper coupling of nucleus and centrosome. Finally, analysis of the overall speed

of the centrosome showed that it was reduced in cilium-ablated and AC3 knocked-down neurons as compared to WT (GFP $75,82 \pm 3,44 \mu\text{m}/\text{h}$ versus $56,54 \pm 2,31 \mu\text{m}$ and $55,69 \pm 3,74 \mu\text{m}$ in CRE and MirAC3, $p=0.02$, $n=3$ mice Fig 4F).

Our results thus suggest that AC3 ciliary cAMP production of the hotspot regulates migration by acting on centrosome dynamics and centrosome/nucleus coupling.

Centrosomal PKA is the downstream effector of the hotspot

PKA was described to be localized at the centrosome in certain cell types (Saade et al., 2017b). Immunohistochemical staining for the catalytic subunit of PKA (cPKA) showed that it was indeed the case in RMS migrating cells, where cPKA appeared as a diffuse area surrounding the centrosome (Fig 5A). We thus transfected a dominant form of PKA (dnPKA) coupled with the GFP to delocalize PKA. This dnPKA is a regulatory subunit of PKA, which cannot bind the centrosome and thus traps the endogenous catalytic subunit of PKA in the cytoplasm (Fig 5B). Counting of the percentage of cells displaying cPKA at the centrosome showed that dnPKA efficiently delocalized PKA (26,67% in dnPKA versus 86,05% in WT, data not shown).

We thus analyzed the migration and centrosomal dynamics of dnPKA transfected neurons.

Similarly to cilium deletion and AC3 knock-down, dnPKA transfection slowed down migration (GFP $75,49 \pm 3,48 \mu\text{m}/\text{h}$ versus $55,76 \pm 1,90 \mu\text{m}/\text{h}$ and $63,73 \pm 2,85 \mu\text{m}/\text{h}$ in dnPKA and CREdnPKA, $p < 0.001$, $n=3$ mice, Fig 5C movie 7, 10 and 11), increased pausing phases (76% in WT versus 86% and 84% in dnPKA and CREdnPKA, $p < 0.001$, $n=3$ mice, Fig 5D) and reduced frequency of NK ($3,15 \pm 0,21 \text{ NK}/\text{h}$ in WT versus $2,23 \pm 0,12 \text{ NK}/\text{h}$ and $2,09 \pm 0,16 \text{ NK}/\text{h}$ in dnPKA and CREdnPKA $p < 0.001$ $n=3$ mice, Fig 4C). Moreover, cotransfection with centrin-RFP revealed that centrosome dynamics was also altered in the same way as cilium ablation and AC3 knock-down: centrosome speed was reduced (GFP $75,82 \pm 3,44 \mu\text{m}/\text{h}$ versus $68,18 \pm 2,08 \mu\text{m}$ dnPKA, $p = 0,051$, $n=3$ mice Fig 5H) as well as the maximum distance between centrosome and nucleus during CK (GFP $12,32 \pm 0,42 \mu\text{m}$ versus $10,46 \pm 0,38 \mu\text{m}$ dnPKA, $p < 0.001$ $n=3$ mice, Fig 5F) and the percentage of efficient CK (26% in WT versus 37% in dnPKA, $p = 0.02$, n mice, Fig 5G) Delocalization of PKA from the centrosome thus phenocopies cilium deletion and AC3 knock-down. This strongly suggests that centrosomal PKA is the downstream effector of the ciliary dependent hotspot. To test this possibility, we performed a double mutation of Kif3a lox/lox mice by transfecting Cre to ablate the cilium and dnPKA to delocalize PKA. Interestingly, double mutated neurons displayed the same migratory defects as the simply mutated ones, with no additivity of the phenotypes. This strongly suggests that dnPKA acts downstream of the ciliary produced cAMP to regulate migration.

The hotspot is present in different kind of migrating neurons

In order to know whether this pattern of cAMP dynamics is specific of postnatal RMS neurons or generally used by migrating neurons, we assessed its presence in other types of neurons. Postnatally generated SVZ neurons reorient radially in the olfactory bulb after their migration in the RMS. Ratiometric analysis of the biosensor showed that they too displayed a transient centrosomal hotspot (Fig 6A movie 12). In addition, analysis of tangentially migrating neurons of the adult RMS also displayed the same hotspot (Fig 6B, movie 13). Finally, the hotspot was also present in radially migrating neurons of the embryonic cortex (Fig 6C, movie 14).

We can thus conclude that this type of cAMP dynamics appears to be generally used by migrating neurons.

Discussion

Our work provides evidence that control of cell migration relies on highly compartmentalized and temporally regulated centrosomal cAMP/PKA signals. We show that the primary cilium localized AC3 produces a highly dynamic cAMP microdomain visible at the centrosome during NK. This hotspot regulates migration through centrosomal PKA activation, tuning centrosome dynamics and nucleus-centrosome coupling. This discovery was made possible by the development of a challenging technique involving electroporation of neonatal mice with a sensitive FRET biosensor, coupled with spatially and temporally resolute biphotonic imaging on acute brain sections.

cAMP signaling microdomains analyzed thanks to FRET biosensors have previously been described in different cell types. Interestingly, a study performed in Chinese Hamster Ovary cells transfected with a centrosome targeted biosensor reported a similar centrosomal microdomain which, contrarily to us, displayed low cAMP levels. This “coldspot” was dynamic, disappeared during mitosis and was important for cell cycle progression (Terrin et al., 2012b). cAMP microdomains were also described in diverse neuronal subcompartments such as growth cones, axons and dendrites (Averaimo et al., 2016; Calebiro and Maiellaro, 2014). However, to our knowledge, we are the first to perform this type of analysis in migrating neurons.

We detect a surprisingly dynamic cAMP hotspot at the centrosome, cyclically present during NK and absent during pauses. We show that the primary cilium and ciliary localized AC3 are necessary for formation of the hotspot. We thus think that the signal that we observe at the

centrosome is a consequence of a small range diffusion of the cAMP concentrated in the primary cilium by AC3 production. Two studies using a ciliary targeted FRET-based cAMP sensor in fibroblasts and kidney epithelial cells indeed showed that the primary cilium is a cAMP rich microdomain (Moore et al., 2016b; Sherpa et al., 2019b), reaching levels of concentration as high as 5 fold higher than the rest of the cytoplasm.

The cyclical presence of the hotspot raises interesting questions. A mechanical explanation of the cyclicity could be the dynamics of the cilium itself. Two studies reported that the cilium is highly dynamic during migration of tangentially migrating embryonic neurons (Baudoin et al., 2012b; Higginbotham et al., 2012b), with one of them suggesting a transient disappearance of the cilium during pauses (Baudoin et al., 2012b). If this is the case in RMS migrating neurons, this could explain the disappearance of the hotspot during pauses. The other possible explanation would be the cyclical regulation of AC3 either by intermittent signalization at the level of an upstream signaling receptor or by a cyclical downstream mechanism.

The hotspot disappearance in cilium ablated and AC3 knocked-down neurons is accompanied by migration defects, which strongly suggests that the hotspot regulates migration. The migration defects that we observe are very similar to the ones observed in cilium ablated (Baudoin et al., 2012b) or Arl13B mutated migrating embryonic interneurons (Higginbotham et al., 2012b). As we observed the hotspot in all types of neurons that we analyzed, one could thus imagine that the migratory defects observed in those papers might be the consequence of a defective cAMP/PKA signaling at the centrosome.

PKA subcellular localization closed to its effectors is an essential determinant of cAMP signaling compartmentalization (Torres-Quesada et al., 2017) and is ensured by A Kinase Anchoring Proteins (AKAP). In RMS migrating neurons, PKA detected by immunocytochemistry is mainly associated with the centrosome. Such a centrosomal localization was reported in diverse cell types including radial glial cells (Saade et al., 2017b). RMS neurons strongly express the centrosomal AKAP pericentrin (Diviani et al., 2000; Endoh-Yamagami et al., 2010). Interestingly, pericentrin mutant mice devoid of PACT domain (pericentrin-AKAP450 centrosomal targeting domain) display a very similar migratory phenotype as our mutated cells. This suggests that pericentrin is the main AKAP responsible for PKA centrosomal localization in RMS cells. We used the dominant negative form of PKA described by Saade et al, which is a regulatory subunit of PKA devoid of the domain interacting with pericentrin. This led to efficient PKA delocalization from the centrosome and to the same migratory defects as cilium ablation and AC3 knock-down. This shows that PKA centrosomal localization through interaction with pericentrin is necessary for proper migration and that PKA

is the main downstream effector of the hotspot. The subcellular co-localization of the cAMP hotspot with PKA might ensure that the concentration of the second messenger locally exceeds the activation threshold of PKA, as suggested in (Koschinski and Zaccolo, 2017)

Our data show that the activation of PKA by the ciliary produced cAMP hotspot regulates the speed of migration and the centrosome dynamics. A likely PKA downstream effector could be the LIS1-dynein-nde1-ndeL1 complex, which is localized at the centrosome (Sasaki et al., 2000; Tanaka et al., 2004b) , essential for neuronal migration in diverse types of neurons (Bradshaw et al., 2011a; Shu et al., 2004b; Tsai et al., 2007b) and involved in nucleus-centrosome coupling (Jheng et al., 2018; Tsai et al., 2007b). PKA phosphorylates Nde1 and Nde1, which induces the release of LIS1 and dynein from the complex (Bradshaw et al., 2011a; Tsai et al., 2007b) thus allowing their action on microtubule stability (Hendricks et al., 2012; Sapir, 1997). Interestingly, depletion of LIS1 induces a decrease of N-C distances, a reduced centrosomal speed and a decrease in NK frequency (Tanaka et al., 2004b; Tsai et al., 2007b), which is very similar to our phenotype. This suggests that defectuous LIS1 release consecutive to the hotspot disappearance might be important in our phenotype. This would lead to destabilization of microtubules (Sapir, 1997) triggering a defect of microtubule tension between centrosome and nucleus (Bertipaglia et al., 2018). This could explain the defects of centrosome dynamics and of nucleus/centrosome coupling leading to defects in NK.

We thus describe a cAMP-rich microdomain generated in the primary cilium of migrating neurons and extending its action towards the centrosome. This allows localized regulation of centrosomal PKA leading to fine-tuned regulation of neuronal migration. This mode of regulation is present in all types of migrating neurons that we have analyzed. We thus unveil a new regulatory pathway whereby a cilium-generated signal exerts a direct action on the centrosome dynamics with consequences on neuronal migration.

Material and Method

Mouse lines

Mice were housed in a 12-hour light/dark cycle, in cages containing 2 females and one male. The postnatal mice were housed in the cages with their parents. Animal care was conducted in accordance with standard ethical guidelines (National Institutes of Health publication no. 85-23, revised 1985 and European Committee Guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals 86/609/EEC). The experiments were approved by the local ethics committee (Comité d’Ethique en Expérimentation Animale Charles Darwin C2EA-05). The mice used were in a C57BL6 background. Kif3a conditional knockout (Kif3a^{f/f}) (Marszalek et al, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA) and Rpgr1L conditional knockout (Rpgr1L^{f/f}) (Vierkotten et al, 2007, Development), were genotyped according to the original protocols.

Plasmid constructions

pCaggs-Epac-S^{H187} was derived from pCDNA3-Epac-S^{H187} kindly given by Kees Jalink (Klarenbeek et al, 2015). Minor modification on the Epac-S^{H187} sequence was performed to reduce redundancy. pCaggs-GFP, pCaggs-CRE-IRES-GFP and pCaggs-CRE-IRES-Tdtomato were designed in the laboratory. pCIG-PKA RIΔ2-6 wt subunit flagged (call later on pdn-PKA) was kindly given by Elisa Marti (Saade et al, 2017). pCs2-Centrin-RFP was ordered in addgene (#26753). All the plasmids were used at a concentration between 5 to 8μg/μL (0,01% Fast green) for postnatal electroporation, 2μg/μL (0,01% Fast green) for in utero electroporation and 10μg/μL for adult electroporation.

miRNA production

miRNA against AC3 has been performed using BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector kits from invitrogen. To generate the single stranded oligos we used Invitrogen’s RNAi Designer to have increase the possibility to have high rate of knockdown. The sequence of the single stranded oligos are: -for miRNA AC3.1: Top TGCTGAAAGGATGATGTCCAACACCAGTTTTGGCCACTGACTACGTGTTGCATCA TCCTTT, Bottom CCTGAAAGGATGATGCAACACCAGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTGGTGTGGACA TCATCCTTTC, for miRNA AC3.2: Top: TGCTGTGTACATGGTATTGAACTGCTGTTT

TGGCCACTGACTGACAGCAGTTCTAGGATGTACA, bottom:
CCTGTACATGGTAGAA

CTGCTGTCAGTCAGTGGCCAAAACAGCAGTTGAATAGGATGTACAC, for miRNA
AC3.3: Top:

TGCTGTTAGGATGGAGCACACGGGCATGTTTTGGCCACTGACTGACATG
CCGTGCTCCATCCTAA, bottom: CCTGTTAGGATGGAGCACGGGCATGTCAGTCAGT
GGCCAAAACATGCCGTGTGCTCCATCCTAAC. The different step of the kit was
followed. The double stranded oligos were inserted in a pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR. The
three different construction have been sequenced to confirm the proper insertion of the double
stranded oligos. To produce the pcDNATM6.2-GW/Tdtomato-miR, GFP was removed using
Dra1 and BamH1 and tdTomato was added at its place.

To validate miRNA efficiency, Rt-qPCR on NIH3T3 were performed. NIH3T3 were
transfected with a plasmid expressing AC3 and miRNA^{neg} or miRNA-AC3. 48h post-
transfection, NIH3T3 cells were fixed and RNA were extracted.

Postnatal electroporation

Postnatal electroporation was performed at P2. The postnatal mice were anesthetized by
hypothermia. Pseudo-stereotaxic injection (from lambda ML: -1,2, A/P:2, D/V: 2,5-2) using
glass micropipette (Drummond scientific company, wiretol I 50 μ L, 5-000-1050) was performed
and 2 μ L of plasmid was injected. Animals, that were successfully injected, were subject to 5
pulses of 99,99V during 50ms space out of 950ms using the CUY21 SC Electroporator and
10mm tweezer electrode (CUY650-10 Nepagene). The animals were placed on a 37°C plates
to restore their body temperature before returning with their mother. Animal were considered
as full restored when pups were moving naturally and their skin color return to pink.

In utero electroporation

Timed pregnant E15 C57Bl6 mice were anesthetized with isoflurane. During the
experiment the mice was on a 37°C plate. The uterine horns were exposed, and the embryos
were injected in the lateral ventricle with a glass micropipette. 1 μ L of plasmid (2 μ g/ μ L) was
injected. The successfully injected animals were then subject to 5pulse of 45V during 50ms
space out of 950ms using the CUY21 SC Electroporator and 5mm tweezer electrode (CUY650-
5 Nepagene). The uterine horns were then replaced in the belly and the belly was sew up. The

animals were placed in a cage on a 37°C plates to restore their body temperature before returning in their own cage.

Adult electroporation

P21 C57Bl6 animals were anesthetized with a mixed of ketamine and xylazine. Stereotaxic injection (from the bregma M/L: 1, A/P:0, D/V:2,1) was performed with a glass micropipette and 2μL of the plasmids (10μg/μL) was injected in the right lateral ventricle. The animals were then removed from the stereotaxic setting and subject to 5 pulse of 200V during 50ms space out of 950ms using the electroporator NEPA21 with 10mm tweezer electrode (CUY650-10). The animals were then placed on a 37°C plates to restore their body temperature before returning in their cage.

Acute brain slices

Brain slices from mice aged from P6 to P10 were prepared as previously described (Castro et al. 2010). Pups were killed by decapitation and the brain was quickly removed from the skull. 250μm sagittal brain slices were cut with a VT1200S microtome (Leica). Slices were prepared in the ice-cold cutting solution of the following composition: 125mM NaCl, 0.4mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1.25mM NaH₂PO₄, 26mM NaHCO₃, 5mM sodium pyruvate, 20mM glucose and 1mM kynurenic acid, saturated with 5% CO₂ and 95% O₂. Slices were incubated in this solution for 30 min at room temperature and then placed in recording solution (identical to the solution used for cutting, except that the Ca²⁺ concentration was 2mM and kynurenic acid was absent) for at least 30 min at 32°C before image acquisition.

Brain slices from E18 were prepared as follows. The mother was killed by cervical dislocation and the embryos were removed from the horn and placed in an ice-cold cutting solution (same composition as above). The embryos were decapitated, and the brain was quickly removed from the skull. 300μm sagittal brain slices were cut in the same ice-cold solution. Then the same protocol as above was followed.

P30 brain slices were prepared as follows. The mice were killed by cervical dislocation. The brain was quickly removed from the skull. 200μm sagittal brain slices were cut with a VT1200S microtome (Leica). Slices were prepared in an ice-cold solution of the following composition: 130mM potassium gluconate, 15mM KCl, 2mM EGTA, 20mM HEPES, 25mM glucose, 1mM CaCl₂ and 6mM MgCl₂, supplemented with 0.05mM D-APV (304 mOsm, pH 7.4 after equilibration) saturated with 5% CO₂ and 95% O₂ (Quiquempoix et al., 2018). Then

the slices were placed for 3 to 5 minutes in a ice-cold solution of the following composition: 225mM D-mannitol, 2.5mM KCl, 1.25mM NaH₂PO₄, 25mM NaHCO₃, 25mM glucose, 1mM CaCl₂ and 6mM MgCl₂ (Quiquempoix et al., 2018) saturated with 5% CO₂ and 95% O₂ before being placed in the recording solution (described above) at 32°C and saturated with 5% CO₂ and 95% O₂ for at least 30 min.

Time-lapse video microscopy

To analyze cell migration, images were obtained with an inverted SP5D confocal microscope (Leica). Images were taken every 3 min for 2-3h using a 40X/ N.A. 1,25 objective with 1.5 optical zoom.

Biosensor images were acquired with an upright multiphoton microscope Leica SP5 MPII with a 25x/ N.A 0,95, objective, 4x optical zoom, and GaAsP hybrid detector. The excitation wavelength was set at 850 nm to activate the mTurquoise2. The two emission wavelengths were acquired at the same time with filters of 479+/-40 nm and 540+/-50 nm. Image stacks with 2 µm vertical interval were taken every minute for 1h. The presence of tdTomato, indicative of CRE recombinase or miRNA, was assessed with a confocal head were taken before and after 1hour movies to detect the expression of tdTomato. For the centrin-RFP, alternation of the FRET acquisition with the multiphoton and RFP with a confocal laser was performed.

The temperature in the microscope chamber was maintained at 32°C, for embryos and postnatal imaging, or 35°C, for P30 imaging, and brain slices were continuously perfused with heated recording solution (see above) saturated with 5% CO₂ and 95% O₂

Analyses of neuronal migration

Analyses were performed using ImageJ (NIH Image; National Institutes of Health, Bethesda, MD) software and MTrackJ plugging (Meijering et al., 2012). The nucleus and the centrosome of each cell were tracked manually on each time frame during the whole movie. For cell migration characteristics, calculation of speed, nuclear translocation frequency and pausing time were performed using the x,y,t coordinates of the nucleus of each cell. For centrosome defect, calculation of speed of centrosome, maximal Nucleus-centrosome distance and CK-NK coupling were performed using the x,y,t coordinates of centrosome and nucleus of each cell.

Nuclear Speed formula:

$$\text{Speed} = \sqrt{((x_t - x_{t-1})^2 + (y_t - y_{t-1})^2)} \times 20$$

NK frequency was calculated as followed:

$$\text{NK frqcy} = \frac{\text{NK Nber}}{\text{Total Time}} \times 60$$

Percentage of pausing time was calculated as followed:

Cells were excluded from the analysis if we tracked them less than 30 min or did not performed any nuclear translocation during the whole tracking. To analyse the percentage of pausing time, a distance cutoff was used to discriminate pausing time from nuclear translocation. If the distance of migration was equal or superior to 6µm, cells were considered as migrating. If the distance of migration was inferior to 6µm, cells were considered as pausing.

$$\% \text{ pausing time} = \frac{\text{Nber of pausing time}}{\text{Total time number} - 1} \times 100$$

Centrosome Speed formula:

$$\text{Speed} = \sqrt{((x_t - x_{t-1})^2 + (y_t - y_{t-1})^2)} \times 20$$

NK-CK coupling was calculated as followed:

To analyse centrokinesis, a cutoff was used to discriminate pause and migration. If the distance of centrosome movement was equal or superior to 2µm, centrosome were considered as migrating. If the distance of migration was inferior to 2µm, cells were considered as pausing. At every centrokinesis, we observed if a nucleokinesis was associated to it. If a nucleokinesis was following a centrokinesis, NK-CK was considered coupling. When a centrokinesis was not followed by a nucleokinesis, NK-CK was considered uncoupling.

$$\text{NK-CK coupling Frqcy} = \frac{\text{Nber of CK followed by NK}}{\text{Total time number} - 1} \times 60$$

N-C max distance was calculated as followed:

Maximal distance between centrosome and nucleus of every centrokinesis was considered. Averages of the N-C maximal distances of every centrokinesis per cell was used to create the graph.

Quantification of biosensor images

Image stacks obtained for donor and acceptor emission were processed with a custom code developed in the IGOR Pro environment (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA). The maximum intensity was projected vertically to form a 2D image. The fluorescence intensity of donor and acceptor were averaged to build an image indicating biosensor concentration. The fluorescence intensity of donor and acceptor were ratioed for each pixel to report biosensor activation level. For each experiment, ratio values were multiplied by a constant such that baseline ratio was 1. These images were combined to produce pseudocolor images, with the ratio used as hue (from blue to red) and the intensity as value, while the saturation was set to the maximum (Polito et al., 2014; Tsien and Harootunian, 1990).

For each migrating neuron, the ratio was then measured along its migration direction, calculated as follows. A series of anchor points were manually positioned along the length of the cell, and the profile of ratio and intensity was calculated along these line segments, over a total width of 1 μm . The intensity profile was annotated manually, marking the rear of the cell and the tip of the leading process of the migrating neuron, and both sides of the nucleus. The movement of the nucleus was then used to determine the orientation of the migration, by fitting a line to the positions of the nucleus for all time points. Coordinates in the frame of reference of the image were then converted to a single position along the axis of cell migration.

Ratio measurements in the frame of reference of cell migration were then used to build kymographs with the same color coding as pseudocolor biosensor images. Profiles showing a hotspot were further analyzed by fitting the peak with a gaussian curve.

Immunohistochemistry

P7-P10 mice were lethally anesthetized using euthasol. Intracardiac perfusion with 4% paraformaldehyde were performed. Brain were postfixed overnight in 4% paraformaldehyde. Three rinse were done with PBS 1x (gibco 1400-067). 50 μm sagittal slices were cut with VT1200S microtome (Leica). Slices were placed one hour in a saturated solution (10% fetal bovine serum; 0,5% Triton-X in PBS). The primary antibodies used in this study were: GFP (Aves, GFP-1020, 1/1000), PKAc (Cell Signaling Technology, #4782 1/250), AC3 (Santa Cruz, C-20 sc-588, 1/200), Arl13b (UC Davis/NIH NeuroMab Facility, 75-287, 1/1000), α -tubulin (Sigma-Aldrich, T6557, 1/500). The antibodies were diluted in saturation solution. Slices were incubated 48 to 72h at 4°C with agitation with the antibodies. Three rinse were done with PBS 1x. The secondary antibodies used were : anti-chicken IgY alexa Fluor 488 (1/1000, Jackson

ImmunoResearch: 703-545-155) against anti-GFP, anti-rabbit IgG Cy5 (1/1000, Jackson ImmunoResearch: 711-175-152) against anti-PKAc, anti-rabbit IgG Cy3 (1/2000, Jackson ImmunoResearch: 711-165-152) against anti-AC3, anti-Mouse IgG, Fcγ Subclass 1 specific alexa Fluor 594 (1/2000, Jackson ImmunoResearch: 115-585-205) against anti-γ-tubulin, anti-Mouse IgG, Fcγ subclass 2a specific alexa Fluor 647 (1/1000, Jackson ImmunoResearch: 115-605-206) against anti-Arl13b . The antibodies were diluted in saturation solution. Slices were incubated 1h at room temperature with agitation with the secondary antibody solution. Three rinse with PBS 1X were done. Slices were counter-colored with Hoeschest and mounted with mowiol.

Statistics

All manipulations and statistical analyses were implemented with R (3.5.1). Normality in the variable distributions was assessed by the Shapiro-Wilk test. Furthermore, the Levene test was performed to probe homogeneity of variances across groups. Variables that failed the Shapiro-Wilk or the Levene test were analyzed with nonparametric statistics using the one-way Kruskal–Wallis analysis of variance on ranks followed by Nemenyi test post hoc and Mann–Whitney rank sum tests for pair-wise multiple comparisons. Variables that passed the normality test were analyzed by means of one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test for multiple comparisons or by Student's t test for comparing two groups. Categorical variables were compared using Pearson's Chi-squared test or Fisher's exact test. All the statistical analyses have been performed on the fifth group together.

Principal component analysis (PCA) was performed using all the variables analyzed in the study, and the experimental conditions were included as supplementary variables.

A p value of < 0.05 was used as a cutoff for statistical significance. Results are presented as the mean $\pm$ SD or medians and the given values in the text are the mean $\pm$ SEM, unless otherwise stated. The statistical tests are described in each figure legend.

All the statistics have been performed between the 5th different groups.

Bibliography

- Arts, H.H., Doherty, D., van Beersum, S.E.C., Parisi, M.A., Letteboer, S.J.F., Gorden, N.T., Peters, T.A., Märker, T., Voosenek, K., Kartono, A., et al. (2007). Mutations in the gene encoding the basal body protein RPGRIP1L, a nephrocystin-4 interactor, cause Joubert syndrome. *Nat. Genet.* 39, 882–888.
- Averaimo, S., Assali, A., Ros, O., Couvet, S., Zagar, Y., Genescu, I., Rebsam, A., and Nicol, X. (2016). A plasma membrane microdomain compartmentalizes ephrin-generated cAMP signals to prune developing retinal axon arbors. *Nat. Commun.* 7, 12896.
- Baudoin, J.-P., Viou, L., Launay, P.-S., Luccardini, C., Espeso Gil, S., Kiyasova, V., Irinopoulou, T., Alvarez, C., Rio, J.-P., Boudier, T., et al. (2012). Tangentially Migrating Neurons Assemble a Primary Cilium that Promotes Their Reorientation to the Cortical Plate. *Neuron* 76, 1108–1122.
- Bellion, A., Baudoin, J.-P., Alvarez, C., Bornens, M., and Métin, C. (2005). Nucleokinesis in Tangentially Migrating Neurons Comprises Two Alternating Phases: Forward Migration of the Golgi/Centrosome Associated with Centrosome Splitting and Myosin Contraction at the Rear. *J. Neurosci.* 25, 5691–5699.
- Belvindrah, R., Natarajan, K., Shabajee, P., Bruel-Jungerman, E., Bernard, J., Goutierre, M., Moutkine, I., Jaglin, X.H., Savariradjane, M., Irinopoulou, T., et al. (2017). Mutation of the α -tubulin Tuba1a leads to straighter microtubules and perturbs neuronal migration. *J. Cell Biol.* 216, 2443–2461.
- Bertipaglia, C., Gonçalves, J.C., and Vallee, R.B. (2018). Nuclear migration in mammalian brain development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 82, 57–66.
- Bishop, G.A., Berbari, N.F., Lewis, J., and Myktyyn, K. (2007). Type III adenylyl cyclase localizes to primary cilia throughout the adult mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 505, 562–571.
- Bradshaw, N.J., Soares, D.C., Carlyle, B.C., Ogawa, F., Davidson-Smith, H., Christie, S., Mackie, S., Thomson, P.A., Porteous, D.J., and Millar, J.K. (2011). PKA Phosphorylation of NDE1 Is DISC1/PDE4 Dependent and Modulates Its Interaction with LIS1 and NDEL1. *J. Neurosci.* 31, 9043–9054.
- Calebiro, D., and Maiellaro, I. (2014). cAMP signaling microdomains and their observation by optical methods. *Front. Cell. Neurosci.* 8.
- Diviani, D., Langeberg, L.K., Doxsey, S.J., and Scott, J.D. (2000). Pericentrin anchors protein kinase A at the centrosome through a newly identified RII-binding domain. *Curr. Biol.* 10, 417–420.
- Endoh-Yamagami, S., Karkar, K.M., May, S.R., Cobos, I., Thwin, M.T., Long, J.E., Ashique, A.M., Zarbalis, K., Rubenstein, J.L.R., and Peterson, A.S. (2010). A mutation in the pericentrin gene causes abnormal interneuron migration to the olfactory bulb in mice. *Dev. Biol.* 340, 41–53.
- Guemez-Gamboa, A., Coufal, N.G., and Gleeson, J.G. (2015). Primary cilia in the developing

and mature brain. 21.

- Guo, J., Otis, J.M., Higginbotham, H., Monckton, C., Cheng, J., Asokan, A., Mykytyn, K., Caspary, T., Stuber, G.D., and Anton, E.S. (2017). Primary Cilia Signaling Shapes the Development of Interneuronal Connectivity. *Dev. Cell* 42, 286-300.e4.
- Haase, A. (2003). Nitric oxide and cyclic nucleotides are regulators of neuronal migration in an insect embryo. *Development* 130, 3977–3987.
- Hendricks, A.G., Lazarus, J.E., Perlson, E., Gardner, M.K., Odde, D.J., Goldman, Y.E., and Holzbaur, E.L.F. (2012). Dynein Tethers and Stabilizes Dynamic Microtubule Plus Ends. *Curr. Biol.* 22, 632–637.
- Higginbotham, H., Eom, T.-Y., Mariani, L.E., Bachleda, A., Hirt, J., Gukassyan, V., Cusack, C.L., Lai, C., Caspary, T., and Anton, E.S. (2012). Arl13b in Primary Cilia Regulates the Migration and Placement of Interneurons in the Developing Cerebral Cortex. *Dev. Cell* 23, 925–938.
- Howe, A.K. (2011). Cross-talk between calcium and protein kinase A in the regulation of cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 554–561.
- Jheng, G.-W., Hur, S.S., Chang, C.-M., Wu, C.-C., Cheng, J.-S., Lee, H.-H., Chung, B.-C., Wang, Y.-K., Lin, K.-H., del Álamo, J.C., et al. (2018). Lis1 dysfunction leads to traction force reduction and cytoskeletal disorganization during cell migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 497, 869–875.
- Klarenbeek, J., Goedhart, J., van Batenburg, A., Groenewald, D., and Jalink, K. (2015). Fourth-generation epac-based FRET sensors for cAMP feature exceptional brightness, photostability and dynamic range: characterization of dedicated sensors for FLIM, for ratiometry and with high affinity. *PloS One* 10, e0122513.
- Koschinski, A., and Zaccolo, M. (2017). Activation of PKA in cell requires higher concentration of cAMP than in vitro: implications for compartmentalization of cAMP signalling. *Sci. Rep.* 7, 14090.
- Lefkimmiatis, K., and Zaccolo, M. (2014). cAMP signaling in subcellular compartments. *Pharmacol. Ther.* 143, 295–304.
- Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1994). To investigate whether SVZ cells from adult mice could differentiate into neurons. 264, 5.
- Lois, C., Garcia-Verdugo, J.-M., and Alvarez-Buylla, A. (1996). Chain Migration of Neuronal Precursors. *Science* 271, 978–981.
- Maiellaro, I., Lohse, M.J., Kittel, R.J., and Calebiro, D. (2016). cAMP Signals in Drosophila Motor Neurons Are Confined to Single Synaptic Boutons. *Cell Rep.* 17, 1238–1246.
- Meijering, E., Dzyubachyk, O., and Smal, I. (2012). Methods for Cell and Particle Tracking. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 183–200.

- Moore, B.S., Stepanchick, A.N., Tewson, P.H., Hartle, C.M., Zhang, J., Quinn, A.M., Hughes, T.E., and Mirshahi, T. (2016). Cilia have high cAMP levels that are inhibited by Sonic Hedgehog-regulated calcium dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 13069–13074.
- Munno, D.W., Prince, D.J., and Syed, N.I. (2003). Synapse Number and Synaptic Efficacy Are Regulated by Presynaptic cAMP and Protein Kinase A. *J. Neurosci.* *23*, 4146–4155.
- Nicol, X., Bennis, M., Ishikawa, Y., Chan, G.C.-K., Repérant, J., Storm, D.R., and Gaspar, P. (2006). Role of the calcium modulated cyclases in the development of the retinal projections. *Eur. J. Neurosci.* *24*, 3401–3414.
- Nishiyama, M., Hoshino, A., Tsai, L., Henley, J.R., Goshima, Y., Tessier-Lavigne, M., Poo, M., and Hong, K. (2003). Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature* *423*, 990–995.
- Polito, M., Vincent, P., and Guiot, E. (2014). Biosensor imaging in brain slice preparations. *Methods Mol Biol.*
- Quiquempoix, M., Fayad, S.L., Boutourlinsky, K., Leresche, N., Lambert, R.C., and Bessaih, T. (2018). Layer 2/3 Pyramidal Neurons Control the Gain of Cortical Output. *Cell Rep.* *24*, 2799-2807.e4.
- Rosenbaum, J.L., and Witman, G.B. (2002). Intraflagellar transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 813–825.
- Saade, M., Gonzalez-Gobartt, E., Escalona, R., Usieto, S., and Martí, E. (2017). Shh-mediated centrosomal recruitment of PKA promotes symmetric proliferative neuroepithelial cell division. *Nat. Cell Biol.* *19*, 493–503.
- Sapir, T. (1997). Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *EMBO J.* *16*, 6977–6984.
- Sasaki, S., Shionoya, A., Ishida, M., Gambello, M.J., Yingling, J., Wynshaw-Boris, A., and Hirotsume, S. (2000). A LIS1/NUDEL/Cytoplasmic Dynein Heavy Chain Complex in the Developing and Adult Nervous System. *Neuron* *28*, 681–696.
- Schaar, B.T., and McConnell, S.K. (2005). Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 13652–13657.
- Shelly, M., Lim, B.K., Cancedda, L., Heilshorn, S.C., Gao, H., and Poo, M. -m. (2010). Local and Long-Range Reciprocal Regulation of cAMP and cGMP in Axon/Dendrite Formation. *Science* *327*, 547–552.
- Sherpa, R.T., Mohieldin, A.M., Pala, R., Wachten, D., Ostrom, R.S., and Nauli, S.M. (2019). Sensory primary cilium is a responsive cAMP microdomain in renal epithelia. *Sci. Rep.* *9*, 6523.
- Shu, T., Ayala, R., Nguyen, M.-D., Xie, Z., Gleeson, J.G., and Tsai, L.-H. (2004). Ndel1 Operates in a Common Pathway with LIS1 and Cytoplasmic Dynein to Regulate Cortical Neuronal Positioning. *Neuron* *44*, 263–277.

- Silva, C.G., Peyre, E., and Nguyen, L. (2019). Cell migration promotes dynamic cellular interactions to control cerebral cortex morphogenesis. 12.
- Tanaka, T., Serneo, F.F., Higgins, C., Gambello, M.J., Wynshaw-Boris, A., and Gleeson, J.G. (2004). Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *J. Cell Biol.* 165, 709–721.
- Terrin, A., Monterisi, S., Stangherlin, A., Zoccarato, A., Koschinski, A., Surdo, N.C., Mongillo, M., Sawa, A., Jordanides, N.E., Mountford, J.C., et al. (2012). PKA and PDE4D3 anchoring to AKAP9 provides distinct regulation of cAMP signals at the centrosome. *J. Cell Biol.* 198, 607–621.
- Toriyama, M., Mizuno, N., Fukami, T., Iguchi, T., Toriyama, M., Tago, K., and Itoh, H. (2012). Phosphorylation of Doublecortin by Protein Kinase A Orchestrates Microtubule and Actin Dynamics to Promote Neuronal Progenitor Cell Migration. *J. Biol. Chem.* 287, 12691–12702.
- Torres-Quesada, O., Mayrhofer, J.E., and Stefan, E. (2017). The many faces of compartmentalized PKA signalosomes. *Cell. Signal.* 37, 1–11.
- Tsai, J.-W., Bremner, K.H., and Vallee, R.B. (2007). Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue. *Nat. Neurosci.* 10, 970–979.
- Tsien, R.Y., and Harootunian, A.T. (1990). Practical design criteria for a dynamic ratio imaging system. *Cell Calcium* 11, 93–109.

Figures

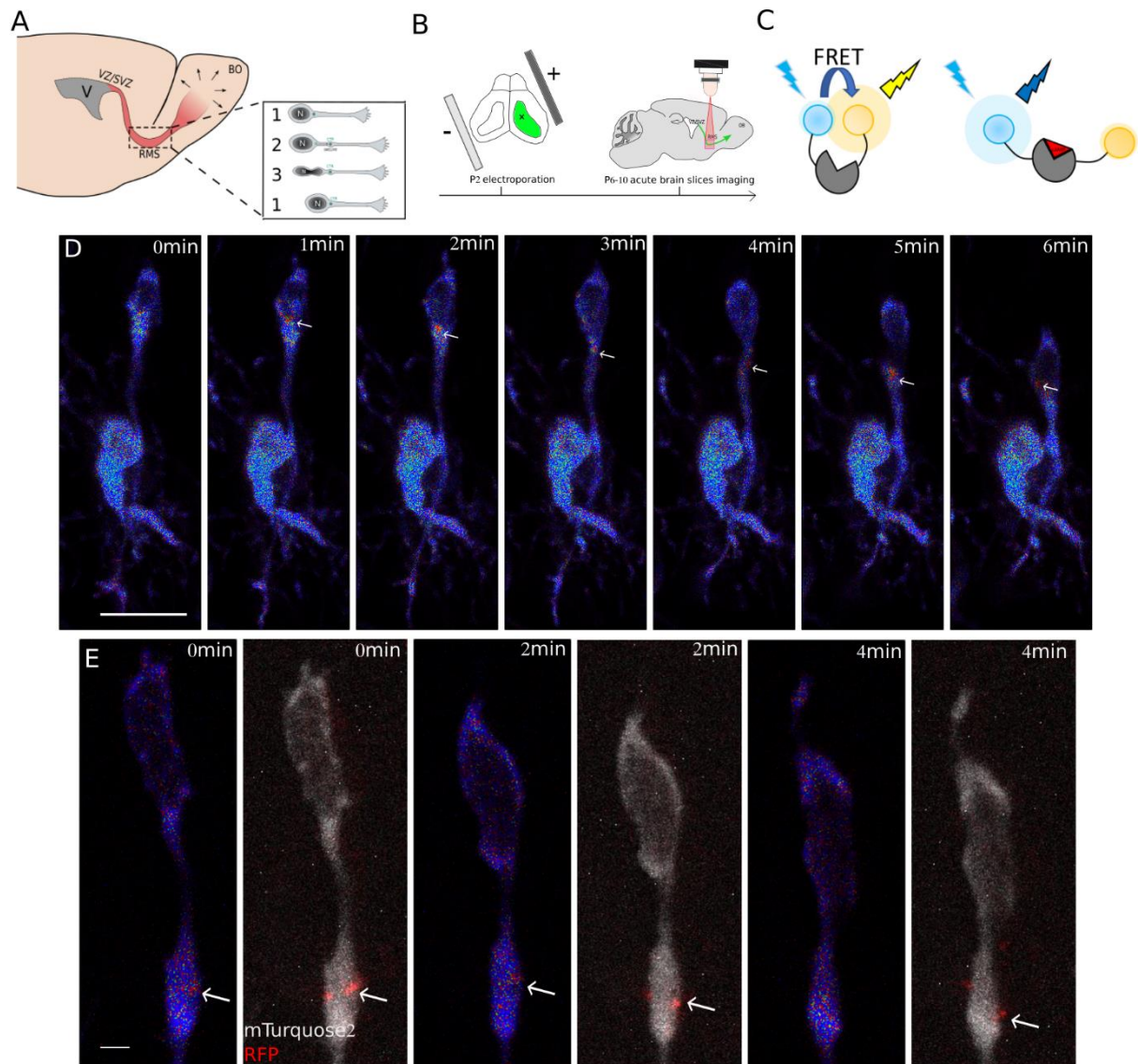


Figure 1: cAMP dynamics in migrating neurons of the mouse postnatal RMS

A) Scheme of VZ/SVZ-OB migration pathway and description of cyclic saltatory migration.

B) Scheme of the postnatal experimental procedure.

C) Scheme of the biosensor Epac-S^{H187}. The cAMP biosensor is composed of a part of Epac protein coupled to a donor and an acceptor fluorophore. The biosensor is in FRET conformation when cAMP is absent (emission at 530 nm upon biphotonic excitation at 850 nm) and non-FRET conformation when cAMP is present (emission at 470 nm upon biphotonic excitation at 850 nm). Changes in cAMP concentration are analyzed by ratiometry and represented by false colors as in D.

D) Live biphotonic imaging of a representative migrating neuron transfected by Epac-S^{H187}. The white arrows show a dynamic cAMP hotspot present during NK. Scale bar 10 μm

E) Live biphotonic and confocal imaging of a representative migrating neuron transfected by Epac-S^{H187} and Centrin-RFP. The white arrows show a dynamic cAMP hotspot present during NK and the centrosome. Scale var 1 μm.

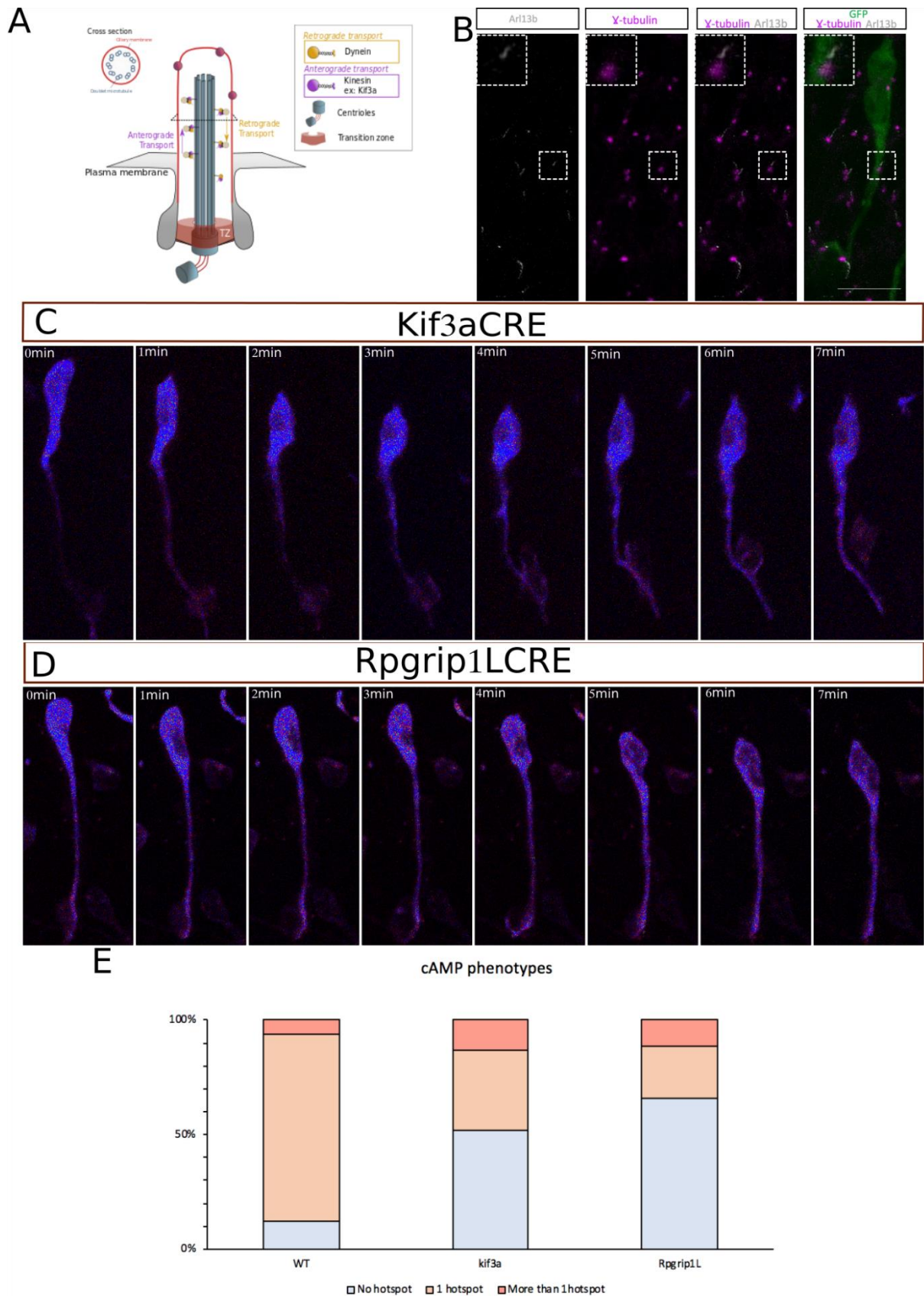


Figure 2: Primary cilium ablation leads to disappearance of the cAMP hotspot.

A) Scheme of a primary cilium.

- B) Immunocytochemistry of a GFP positive RMS neuron showing a short Arl13b positive primary cilium (gray) connected to the γ -tubulin positive centrosome (magenta) . Scale bar 10 μ m
- C) Live biphotonic imaging of a representative migrating neuron transfected by Epac-S^{H187} and Cre recombinase in a Kif3alox/lox mouse. The cAMP hotspot is absent.
- D) Live biphotonic imaging of a representative migrating neuron transfected by Epac-S^{H187} and Cre recombinase in a Rpgriplox/lox mouse. The cAMP hotspot is absent.
- E) Percentage of neurons with no hotspot, one or more than one hotspot in WT or kif3aL/L and Rpgrip1L/L CRE transfected migrating neurons. (WT: N=10 mice, n=101 cells, Kif3a: N=4, n=36, Rpgrip1L: N=5, n=52). (Fisher's Exact Test for Count Data, $p=1.37e^{-12}$)

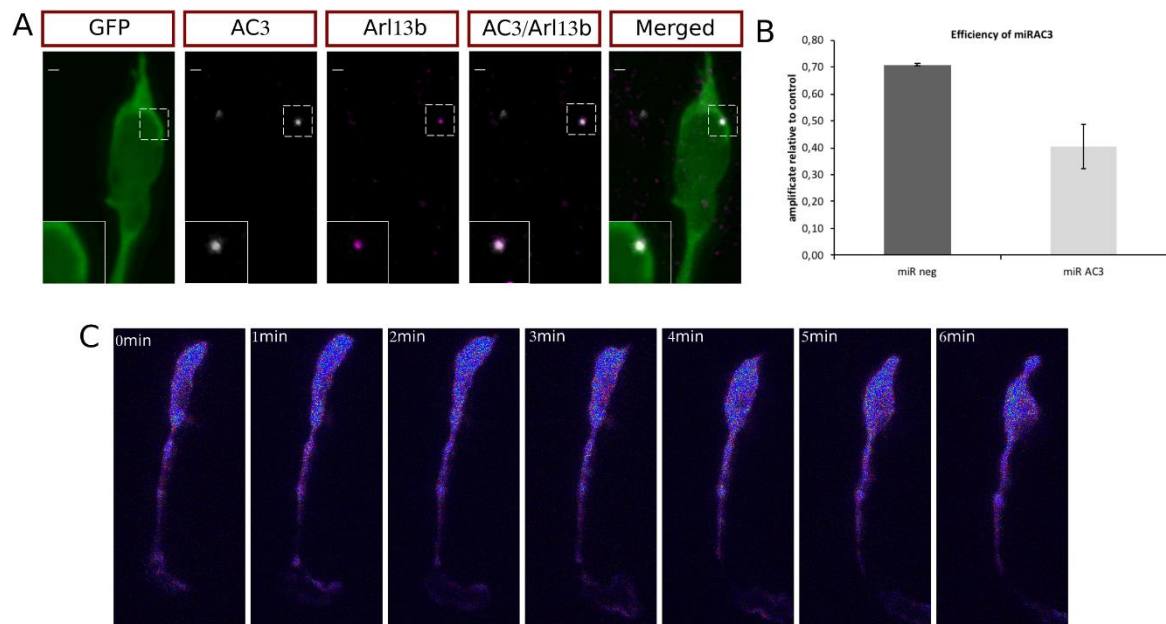


Figure 3: Ciliary AC3 deletion leads to disappearance of the cAMP hotspot

A) Immunocytochemistry of a GFP positive RMS neuron showing AC3 subcellular localization (magenta) in the Arl13B positive primary cilium (gray). Scale bar 1 μ m

B) Histogram representing the efficacy of the miRAC3 observed by RT qPCR.

C) Live biphotonic imaging of a representative migrating neuron transfected by Epac-S^{H187} and MirAC3. The cAMP hotspot is absent.

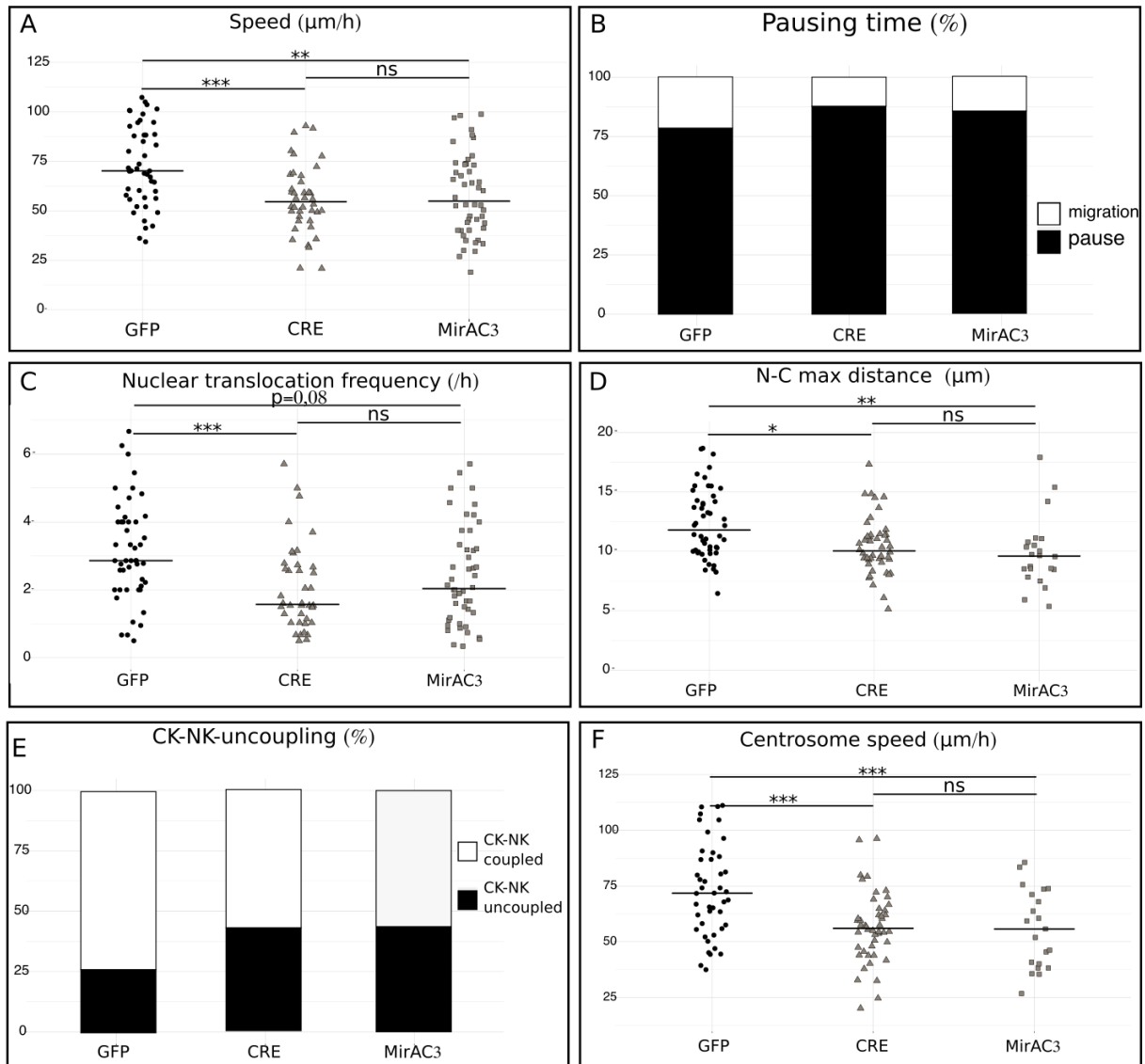


Figure 4: Migration defects after primary cilium ablation and AC3 knock-down

A) Average speed of neurons electroporated with GFP, CRE-GFP or MirAC3-GFP in Kif3aL/L background. The black line represents the median. (one way anova($F_{(4,346)}=7.94$, $p < 0.001$, followed by Tukey HSD test (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$), WT: N=3, n=48, CRE: N=3, n=40, MirAC3: N=2, n=48)

B) Percentage of pausing time of neurons electroporated with GFP, CRE-GFP or MirAC3-GFP in Kif3aL/L background. (WT: N=3, n=48, CRE: N=3, n=40, MirAC3: N=2, n=48) (Pearson's Chi-squared test $X^2= 40.032$, p-value < 0.001)

C) Nuclear translocation frequency of neurons electroporated with GFP, CRE-GFP or MirAC3-GFP in Kif3aL/L background. The black line represents the median. (One-way Kruskal-Wallis test (Chi square $X^2= 19.79$, $p < 0.001$, df = 4, followed by Nemenyi test (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$), WT: N=3, n=48, CRE: N=3, n=40, miRNA-AC3: N=2, n=48)

D) Maximal distance between nucleus and centrosome during CK of neurons electroporated with centrin-RFP and GFP, CRE-GFP or MirAC3-GFP in Kif3aL/L background. The black line represents the median. (One-way Kruskal-Wallis test (Chi square $X^2= 8.11$, $p < 0.001$, df = 3, followed by Nemenyi test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$), WT: N=3, n=50, CRE: N=3, n=46, miRNA-AC3: N=2, n=22)

E) Percentage of CK not followed by a NK in neurons electroporated with centrin-RFP and GFP, CRE-GFP or MirAC3-GFP in Kif3aL/L background. (Pearson's Chi-squared test $X^2= 12.23$, p-value = 0.002)

F) Average centrosome speed of neurons electroporated with centrin-RFP and GFP, CRE-GFP or MirAC3-GFP in Kif3aL/L background. The black line represents the median. (one way anova(

$F_{(3194)}=918$, $p = 0.02$, followed by Tukey HSD test (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$), WT: N=3, n=50, CRE: N=3, n=46, miRNA-AC3: N=2, n=22)

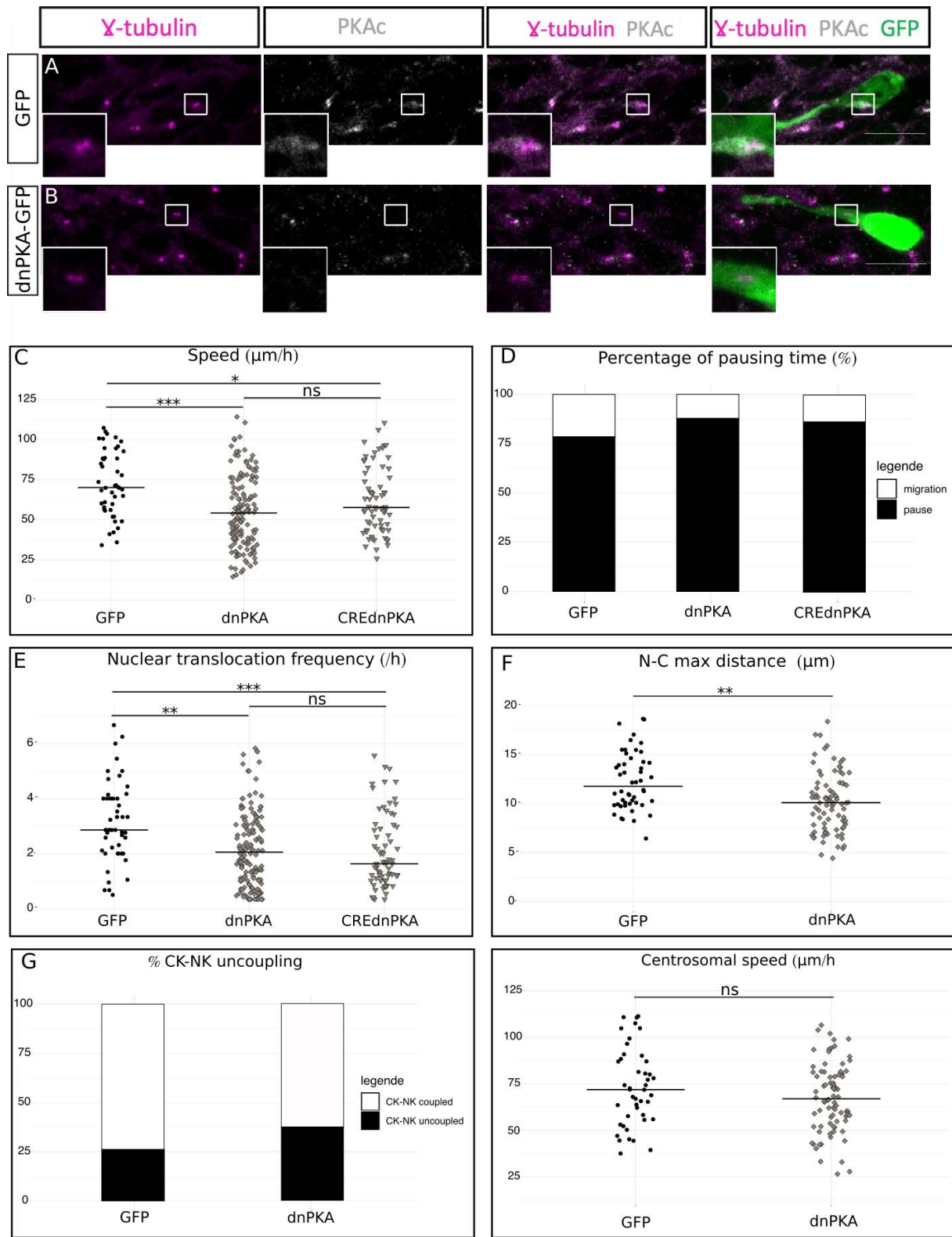


Figure 5: Role of centrosomal PKA

A) Immunocytochemistry of a GFP positive RMS neuron showing PKAc subcellular localization (grey) around γ -tubulin positive centrosome (magenta). Scale bar 10 μ m

B) Immunocytochemistry of a dnPKA-GFP positive RMS neuron showing a delocalisation of PKAc subcellular localization (grey). γ -tubulin labelled the centrosome (magenta). Scale bar 10 μ m.

C) Average speed of neurons electroporated with GFP, dnPKA or dnPKA-GFP plus CRE-TdTomato in Kif3aL/L background. The black line represents the median. (one way anova ($F_{(4,346)}=7.94$,

$p < 0.001$, followed by Tukey HSD test (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$), WT: N=3, n=48, dnPKA: N=3, n=146, CREdnPKA: N=3, n=86)

D) Percentage of pausing time of neurons electroporated with GFP, dnPKA-GFP or dnPKA-GFP/CRE-TdTomato in Kif3aL/L background. The black line represents the median.(WT: N=3, n=48, dnPKA: N=3, n=146, CREdnPKA: N=3, n=86). (Pearson's Chi-squared test $X^2 = 67.25$, p-value < 0.001)

E) Nuclear translocation frequency of neurons electroporated with GFP, dnPKA-GFP or dnPKA-GFP/CRE-TdTomato in Kif3aL/L background. The black line represents the median. (One-way Kruskal-Wallis test (Chi square $X^2 = 19.79$, $p < 0.001$, $df = 4$, followed by Nemenyi test (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$), WT: N=3, n=48, dnPKA: N=3, n=146, CREdnPKA: N=3, n=86)

F) Maximal distance between nucleus and centrosome during CK of neurons electroporated with centrin-RFP and GFP or dnPKA-GFP in Kif3aL/L background. The black line represents the median. (One-way Kruskal-Wallis test (Chi square $X^2 = 8.11$, $p < 0.001$, $df = 3$, followed by Nemenyi test (** $p < 0.01$), WT: N=3, n=50, dnPKA: N=3, n=86)

G) Percentage of CK not followed by a NK in neurons electroporated with centrin-RFP and GFP or dnPKA-GFP in Kif3aL/L background. (Pearson's Chi-squared test $X^2 = 6.06$, p-value = 0.027, WT: N=3, n=50, dnPKA: N=3, n=86)

H) Average centrosome speed of neurons electroporated with centrin-RFP and GFP or dnPKA-GFP in Kif3aL/L background. The black line represents the median. (one way anova($F_{(3194)} = 918$, $p = 0.02$, followed by Tukey HSD test (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$), WT: N=3, n=50, dnPKA: N=3, n=86).

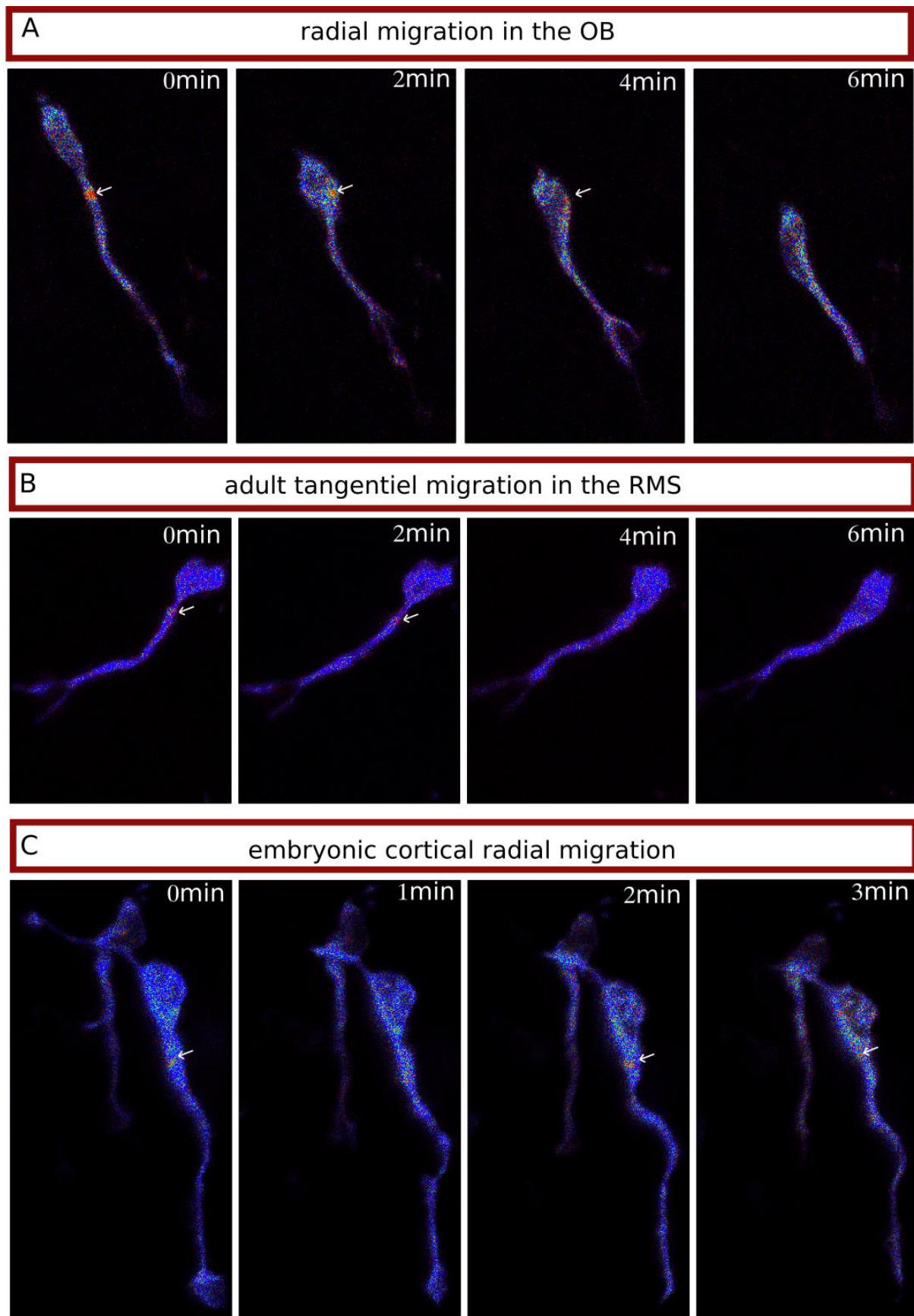


Figure 6: The cAMP hotspot is present in different kind of migrating neurons

A) Live biphotonic imaging of a radially migrating neuron in the olfactory bulb transfected by Epac- S^{H187} . The cAMP hotspot is present during NK.

- B) Live biphotonic imaging of a tangentially migrating neuron in the adult RMS transfected by Epac-S^{H187}. The cAMP hotspot is present during NK.
- C) Live biphotonic imaging of a radially migrating neuron in the embryonic cortex transfected by Epac-S^{H187}. The cAMP hotspot is present during NK.

DISCUSSION/CONCLUSION GENERALE

DISCUSSION/CONCLUSION GENERALE

Dans un premier temps, je vais développer quelques points de discussion et quelques perspectives qui n'ont pas été traités dans l'article précédent. La figure 28 résume schématiquement l'article.

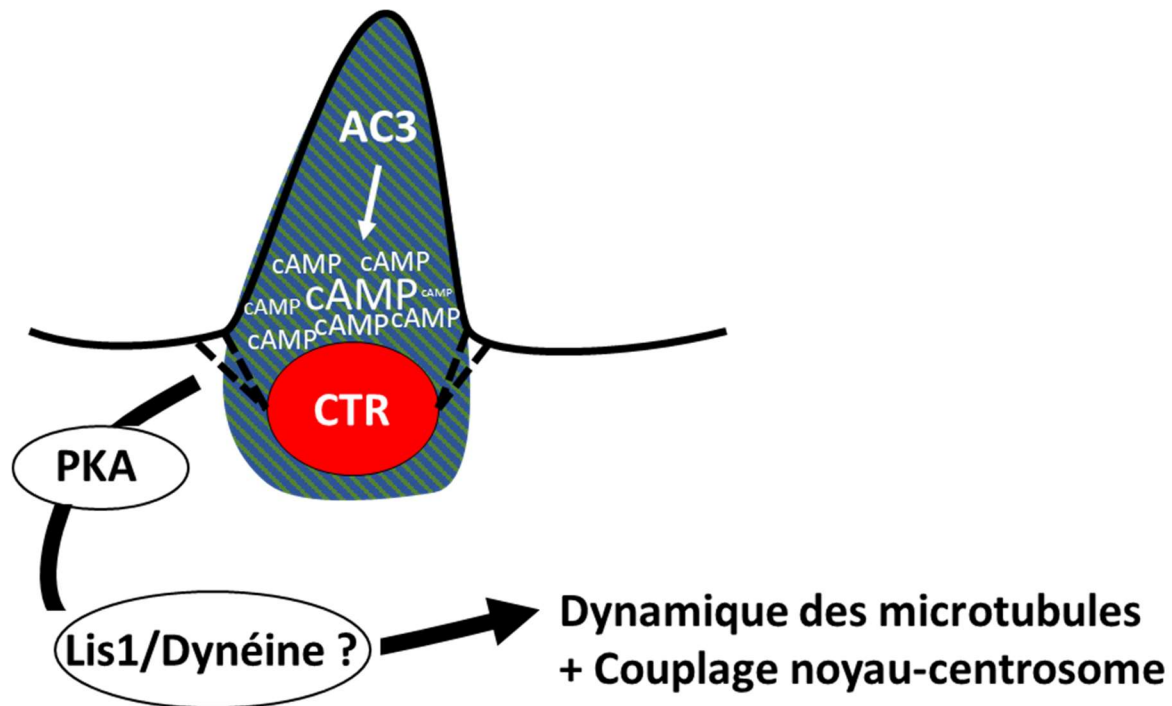


Figure 28 : Schéma récapitulant l'article

La production d'AMPc par l'adénylate cyclase 3 ciliaire et sa diffusion hors du cil permet la génération d'une zone riche en AMPc autour du centrosome. Cette zone active la PKA centrosomale qui régule la migration et en particulier le couplage noyau-centrosome.

La version de l'article présente dans la thèse est la version que nous comptons pré-publier dans BioRxiv puis soumettre à divers journaux prochainement. Nous avons volontairement omis un certain nombre de points dans sa rédaction en attendant le point de vue des referees.

En particulier, nous ne parlons pas dans l'article de candidats de signalisation ciliaire upstream de l'AC3. Nos données sur les souris GliBS-GFP (Figure 27) suggèrent fortement que ce n'est pas Shh. Notre candidat favori est, à l'heure actuelle, le Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP). PACAP se lie à son récepteur PAC1 ce qui active une AC et la PKA (Schou et al., 2015) (Vaudry et al., 1999). PACAP agit de manière autocrine/paracrine (Winters and Moore, 2011) ce qui favorise son action à l'échelle locale. PACAP régule la migration des cellules granulaires du cervelet (Cameron et al., 2009) et la

migration radiaire des neurones corticaux embryonnaires en lien avec DCX (Toriyama et al., 2012). De plus, son récepteur est exprimé dans les neurones en migration du CMR (Matsuno et al., 2008). Nous envisageons d'analyser localisation subcellulaire de ce récepteur par immunohistochimie. S'il s'avère qu'il est ciliaire, nous analyserons l'effet de son knock-down ou de son inactivation pharmacologique sur la migration et sur la présence du hotspot. S'il s'agit du bon candidat, le phénotype de migration devrait être similaire aux mutants ciliaires et autres mutants de l'étude.

De plus, pour mieux comprendre la cyclicité du hotspot qui est présent pendant la nucléokinèse et absent pendant les pauses (Figure 1 de l'article), nous souhaitons analyser la dynamique de l'AMPc en même temps que celle du cil par co-transfection du biosenseur avec Arl13B-RFP. Nous pensons en effet que la disparition de la zone pendant la pause des neurones pourrait être la conséquence d'une disparition provisoire du cil comme décrit dans Baudoin et al., 2012.

Pour vérifier si le complexe impliqué dans l'action de la PKA sur la migration est le complexe Dynéin/Lis1/Nde1/Ndel1 comme nous le suggérons dans la discussion de l'article, nous envisageons de tester l'effet sur la migration d'une forme de Nde1 phospho-mutante i.e. non phosphorylable par la PKA (Bradshaw et al., 2011). Un plasmide de surexpression nous a été envoyé par cette équipe et nous comptons analyser son effet sur la migration.

Enfin, l'expérience qui montrerait définitivement qu'il existe un lien de causalité entre la présence du hotspot et une migration correcte serait d'analyser l'effet de l'activation locale de la PKA au niveau du centrosome sur la migration de neurones sauvages ou avec ablation du cil. C'est une expérience extrêmement challenging techniquement mais théoriquement possible. La première solution serait de décager localement au niveau du centrosome un AMPc photo-activable pour en voir l'effet sur la migration (Boccaccio et al., 2011). Une autre solution serait d'utiliser une PKA photo-activable récemment développée (Leopold et al., 2018) que nous adresserions au centrosome. Pour simplifier le problème, nous réaliserions les expériences sur des neurones migrant en culture et non sur tranches. Il est clair néanmoins que ce type d'expérience nécessiterait beaucoup d'ajustements techniques et de temps, le problème étant notamment la résolution temporelle et spatiale de la photoactivation.

Dans la partie 1, mes résultats montrent que l'ablation du cil a une influence sur la directionnalité des neurones à P10 (Figure 26), augmentant en particulier leur sinuosité. Or, dans l'article, nous ne présentons pas ces données. Il s'agit d'un choix délibéré. En effet, dans les doubles mutants dnPKA plus ablation du cil, nous présentons les données qui montrent

qu'il n'y a pas d'additivité dans les phénotypes de NK (Figure 5 de l'article, condition CREdnPKA). En revanche, nous avons également analysé la sinuosité et observé qu'il y avait additivité des effets des deux mutations (non montré). Cela tend à suggérer que le cil et la PKA ne sont pas dans la même voie de signalisation pour la sinuosité alors qu'ils le sont dans la régulation de la NK. Une interprétation possible serait qu'il y ait deux voies de régulation indépendantes de la sinuosité et potentiellement du guidage : une voie ciliaire indépendante de PKA et une voie extraciliaire dépendante de PKA. La voie ciliaire indépendante de PKA pourrait par exemple être Slit qui guide les neurones du CMR (Sawamoto et al., 2006), dont le récepteur Robo est ciliaire (Higginbotham et al., 2012) et dont la signalisation passe par la RhoGTPase cdc42 (Wong et al., 2001). La voie extra-ciliaire dépendante de PKA pourrait par exemple être la voie Netrin1/DCC qui régule la directionnalité des neurones du CMR postnatal (Murasue and Horwitz, 2002) et dont la voie de signalisation peut activer la PKA (Ming et al., 1997).

Dans l'article, nous avons vérifié la présence du hotspot dans le CMR à P30 (Figure 6B de l'article). Nous montrons que la disparition du cil dans les mutants ciliaires à P10 entraîne la disparition du hotspot d'AMPC. On peut donc supposer que la délétion du cil à P30 entraîne la disparition du hotspot également. Etant donné le rôle primordial que nous attribuons au hotspot dans la migration, il est difficile de comprendre que ces mutants n'aient pas de phénotype de NK apparents (Figure 25). Nous nous interrogeons donc sur l'hypothèse d'une compensation de la mutation au cours du temps. En effet, comme nous introduisons la Cre dans les cellules progénitrices à P2 et observons la migration à P30, on peut se demander si ces cellules n'ont pas eu le temps de générer d'autres mutations pour compenser l'absence de cil. Pour vérifier cela, il faudrait analyser le phénotype de souris infectées par des virus Cre à une date plus proche de la date d'imaging.

CONCLUSION

Pour conclure généralement, nos données montrent un tout nouveau mécanisme par lequel le cil primaire pourrait réguler la migration neuronale. L'importance du cil primaire dans la migration neuronale a été mise en évidence principalement par les équipes de C. Métin (Baudoin et al., 2012) et celle d'E. Anton (Guo et al., 2015; Higginbotham et al., 2012b). Les revues résumant l'importance du cil dans le neurodéveloppement considère de ce fait que le cil primaire est essentiel à la migration (Gomez-Gamboa et al., 2014; Lepanto et al., 2016; Veland et al., 2014). Il est alors considéré comme un hub de signalisation en

particulier en ce qui concerne la signalisation Shh. Cependant, la manière dont la signalisation ciliaire pourrait directement affecter la migration neuronale en termes d'événements intracellulaires reste largement obscure. S. Christensen dans une revue s'intéressant au lien du cil primaire avec la migration neuronale (Veland et al., 2014) dit " The mechanisms by which cilia-mediated signaling is converted into a migratory response are currently not well understood". Nous suggérons que la signalisation au niveau du cil primaire a une influence directe sur le centrosome et l'organisation des microtubules. Le cil primaire n'apparaît donc plus comme une unité de signalisation distincte mais plutôt comme directement couplé au centrosome via la diffusion de l'AMPc jusqu'à celui-ci. L'unité de signalisation serait donc le cil associé au centrosome, une hypothèse déjà évoquée dans la discussion de Baudoin et al., 2012 par C. Métin qui parle du "primary cilium and the associated centrosome as a signaling center able to convert extrinsic signal into morphological changes to influence cell movement". Nos données montrent directement l'influence du cAMP produit au niveau du cil au niveau du centrosome et régulant sa dynamique et donc celle des microtubules. Les résultats de notre futur article par contre n'expliquent en rien comment la signalisation ciliaire pourrait influencer le guidage des neurones ce qui reste totalement mystérieux dans la littérature. Nos données suggèrent plutôt, comme nous l'avons dit plus haut, qu'il existe un mécanisme de guidage dépendant du cil indépendant de la PKA et un autre indépendant du cil et dépendant de la PKA.

L'existence de cette unité de signalisation associant cil et centrosome via diffusion de l'AMPc pourrait être testée dans cellules et événements cellulaires impliquant des mouvements du centrosome associés à un remodelage des microtubules.

Dans un premier temps, nous pourrions analyser la présence du hotspot dans d'autres cellules ciliées migrantes que les neurones. Nous comptons en particulier analyser les fibroblastes dans le test de cicatrisation comme dans (Albrecht-Buehler, 1977; Schneider et al., 2010). Nous pourrions également analyser la présence ou non d'un hotspot pendant leur progression dans le cycle cellulaire et donc en corrélation avec le désassemblage du cil en résultant.

Il serait également passionnant d'observer la dynamique locale de l'AMPc dans les cellules de glie radiaire. Arl13B est une protéine ciliaire dont la mutation est impliquée dans le syndrome de Joubert, une ciliopathie (Guo et al., 2015). L'équipe d'E. Anton montre que la délétion d'Arl13B au stade neuro-épithélial mène à une inversion de la polarité apico-basale des cellules de glie radiaire (Higginbotham et al., 2013). Il serait donc intéressant d'observer la dynamique de l'AMPc pendant l'établissement de la polarité de ces cellules. De plus, les cellules de glie radiaire présentent une forme d'oscillation cyclique de leur noyau nommée

migration nucléaire interkinétique (Figure 29). Cette forme de migration nucléaire implique des mécanismes de régulation intracellulaires commun avec la migration neuronale parmi lesquelles l'importance de la dynéine (Bertipaglia et al., 2018). Il serait donc intéressant d'analyser la dynamique centrosomale de l'AMPc dans ces cellules ciliées au cours du cycle pour de voir si elle pourrait être associée à la migration nucléaire interkinétique qui implique un mouvement du noyau sans mouvement du centrosome. Il serait également de l'observer au cours de la délamination de ces cellules qui implique elle un mouvement conjoint du noyau et du centrosome.

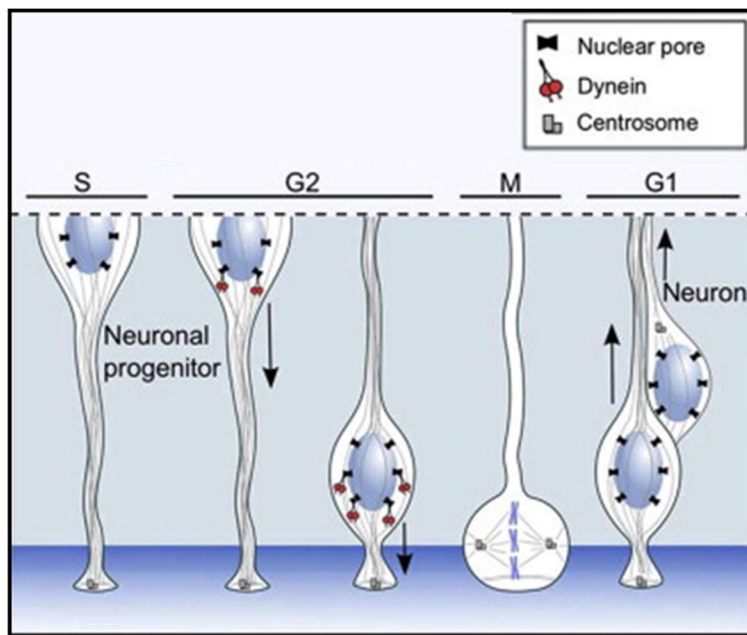


Figure 29 : Schéma de la migration nucléaire interkinétique des cellules de glie radiaire dans le neurépithélium (Hu et al., 2013).

Le cil n'est pas représenté.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, S.R., Harootunian, A.T., Buechler, Y.J., Taylor, S.S., and Tsien, R.Y. (1991). Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature* 349, 694–697.
- Albrecht-Buehler, G. (1977). Phagokinetic tracks of 3T3 cells: Parallels between the orientation of track segments and of cellular structures which contain actin or tubulin. *Cell* 12, 333–339.
- Alvarez-Buylla, A., and Garcia-Verdugo, J.M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 629–634.
- Angot, E., Loulier, K., Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Gadeau, A.-P., Ruat, M., and Traiffort, E. (2008). Chemoattractive Activity of Sonic Hedgehog in the Adult Subventricular Zone Modulates the Number of Neural Precursors Reaching the Olfactory Bulb. *STEM CELLS* 26, 2311–2320.
- Aoyagi, Y., Hibi, T., Kimori, Y., Sawada, M., Kawakami, R., Sawamoto, K., and Nemoto, T. (2018). Heterogeneous distribution of doublecortin-expressing cells surrounding the rostral migratory stream in the juvenile mouse. *J. Comp. Neurol.* 526, 2631–2646.
- Archer, F.L., and Wheatley, D.N. (1971). Cilia in cell-cultured fibroblasts. II. Incidence in mitotic and post-mitotic BHK 21-C13 fibroblasts. *J. Anat.* 109, 277–292.
- Averaimo, S., and Nicol, X. (2014). Intermingled cAMP, cGMP and calcium spatiotemporal dynamics in developing neuronal circuits. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 376.
- Balaskas, N., Ribeiro, A., Panovska, J., Dessaud, E., Sasai, N., Page, K.M., Briscoe, J., and Ribes, V. (2012). Gene Regulatory Logic for Reading the Sonic Hedgehog Signaling Gradient in the Vertebrate Neural Tube. *Cell* 148, 273–284.
- Balenci, L., Saoudi, Y., Grunwald, D., Deloulme, J.C., Bouron, A., Bernards, A., and Baudier, J. (2007). IQGAP1 regulates adult neural progenitors in vivo and vascular endothelial growth factor-triggered neural progenitor migration in vitro. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 4716–4724.
- Barkovich, A.J., Kuzniecky, R.I., Dobyns, W.B., Jackson, G.D., Becker, L.E., and Evrard, P. (1996). A classification scheme for malformations of cortical development. *Neuropediatrics* 27, 59–63.
- Barnes, B.G. (1961). Ciliated secretory cells in the pars distalis of the mouse hypophysis. *J. Ultrastruct. Res.* 5, 453–467.

- Battista, D., and Rutishauser, U. (2010). Removal of Polysialic Acid Triggers Dispersion of Subventricularly Derived Neuroblasts into Surrounding CNS Tissues. *J. Neurosci.* 30, 3995–4003.
- Baudoin, J.-P., Viou, L., Launay, P.-S., Luccardini, C., Espeso Gil, S., Kiyasova, V., Irinopoulou, T., Alvarez, C., Rio, J.-P., Boudier, T., et al. (2012a). Tangentially Migrating Neurons Assemble a Primary Cilium that Promotes Their Reorientation to the Cortical Plate. *Neuron* 76, 1108–1122.
- Baudoin, J.-P., Viou, L., Launay, P.-S., Luccardini, C., Espeso Gil, S., Kiyasova, V., Irinopoulou, T., Alvarez, C., Rio, J.-P., Boudier, T., et al. (2012b). Tangentially Migrating Neurons Assemble a Primary Cilium that Promotes Their Reorientation to the Cortical Plate. *Neuron* 76, 1108–1122.
- Bellion, A., Baudoin, J.-P., Alvarez, C., Bornens, M., and Métin, C. (2005). Nucleokinesis in Tangentially Migrating Neurons Comprises Two Alternating Phases: Forward Migration of the Golgi/Centrosome Associated with Centrosome Splitting and Myosin Contraction at the Rear. *J. Neurosci.* 25, 5691–5699.
- Bergmann, O., Spalding, K.L., and Frisén, J. (2015). Adult Neurogenesis in Humans. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a018994.
- Bertipaglia, C., Gonçalves, J.C., and Vallee, R.B. (2018). Nuclear migration in mammalian brain development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 82, 57–66.
- Bilimoria, P.M., de la Torre-Ubieta, L., Ikeuchi, Y., Becker, E.B.E., Reiner, O., and Bonni, A. (2010). A JIP3-Regulated GSK3 β /DCX Signaling Pathway Restricts Axon Branching. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 16766–16776.
- Bloodgood, R.A. (2009). From central to rudimentary to primary: the history of an underappreciated organelle whose time has come. The primary cilium. *Methods Cell Biol.* 94, 3–52.
- Boccaccio, A., Sagheddu, C., and Menini, A. (2011). Flash Photolysis of Caged Compounds in the Cilia of Olfactory Sensory Neurons. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Bovetti, S., Hsieh, Y.-C., Bovolin, P., Perroteau, I., Kazunori, T., and Puche, A.C. (2007). Blood Vessels Form a Scaffold for Neuroblast Migration in the Adult Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* 27, 5976–5980.
- Bradshaw, N.J., Soares, D.C., Carlyle, B.C., Ogawa, F., Davidson-Smith, H., Christie, S., Mackie, S., Thomson, P.A., Porteous, D.J., and Millar, J.K. (2011). PKA Phosphorylation of NDE1 Is DISC1/PDE4 Dependent and Modulates Its Interaction with LIS1 and NDEL1. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 9043–9054.

- Brailov, I., Bancila, M., Brisorgueil, M.J., Miquel, M.C., Hamon, M., and Vergé, D. (2000). Localization of 5-HT(6) receptors at the plasma membrane of neuronal cilia in the rat brain. *Brain Res.* 872, 271–275.
- Broekhuis, J.R., Leong, W.Y., and Jansen, G. (2013). Regulation of cilium length and intraflagellar transport. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 303, 101–138.
- Butts, T., Green, M.J., and Wingate, R.J.T. (2014). Development of the cerebellum: simple steps to make a “little brain.” *Dev. Camb. Engl.* 141, 4031–4041.
- Cahana, A., Escamez, T., Nowakowski, R.S., Hayes, N.L., Giacobini, M., von Holst, A., Shmueli, O., Sapir, T., McConnell, S.K., Wurst, W., et al. (2001). Targeted mutagenesis of *Lis1* disrupts cortical development and *LIS1* homodimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6429–6434.
- Cai, D., Qiu, J., Cao, Z., McAtee, M., Bregman, B.S., and Filbin, M.T. (2001). Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 4731–4739.
- Cameron, D.B., Raoult, E., Galas, L., Jiang, Y., Lee, K., Hu, T., Vaudry, D., and Komuro, H. (2009). Role of PACAP in controlling granule cell migration. *Cerebellum Lond. Engl.* 8, 433–440.
- Caspi, M., Atlas, R., Kantor, A., Sapir, T., and Reiner, O. (2000). Interaction between *LIS1* and doublecortin, two lissencephaly gene products. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2205–2213.
- Chazal, G., Durbec, P., Jankovski, A., Rougon, G., and Cremer, H. (2000). Consequences of Neural Cell Adhesion Molecule Deficiency on Cell Migration in the Rostral Migratory Stream of the Mouse. *J. Neurosci.* 20, 1446–1457.
- Chiamello, S., Dalmaso, G., Bezin, L., Marcel, D., Jourdan, F., Peretto, P., Fasolo, A., and De Marchis, S. (2007). BDNF/TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways. *Eur. J. Neurosci.* 26, 1780–1790.
- Christensen, S.T., and Ott, C.M. (2007). Cell signaling. A ciliary signaling switch. *Science* 317, 330–331.
- Cooper, D.M.F., and Crossthwaite, A.J. (2006). Higher-order organization and regulation of adenylyl cyclases. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 426–431.
- Corbière-Tichane, G. (1971). [Ultrastructure of the sensory system of the maxilla in the larva of Coléoptère cavernicole *Speophyes lucidulus* Delar. (Bathysciinae)]. *J. Ultrastruct. Res.* 36, 318–341.
- Corbit, K.C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A.R., Stainier, D.Y.R., and Reiter, J.F. (2005). Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 437, 1018–1021.

- Corbit, K.C., Shyer, A.E., Dowdle, W.E., Gaulden, J., Singla, V., Chen, M.-H., Chuang, P.-T., and Reiter, J.F. (2008). Kif3a constrains beta-catenin-dependent Wnt signalling through dual ciliary and non-ciliary mechanisms. *Nat. Cell Biol.* *10*, 70–76.
- Corbo, J.C., Deuel, T.A., Long, J.M., LaPorte, P., Tsai, E., Wynshaw-Boris, A., and Walsh, C.A. (2002). Doublecortin is required in mice for lamination of the hippocampus but not the neocortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 7548–7557.
- Corredor, R.G., Trakhtenberg, E.F., Pita-Thomas, W., Jin, X., Hu, Y., and Goldberg, J.L. (2012). Soluble adenylyl cyclase activity is necessary for retinal ganglion cell survival and axon growth. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 7734–7744.
- Cremer, H., Lange, R., Christoph, A., Plomann, M., Vopper, G., Roes, J., Brown, R., Baldwin, S., Kraemer, P., and Scheff, S. (1994). Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* *367*, 455–459.
- Curtis, M.A., Kam, M., Nannmark, U., Anderson, M.F., Axell, M.Z., Wikkelso, C., Holtås, S., van Roon-Mom, W.M.C., Björk-Eriksson, T., Nordborg, C., et al. (2007). Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* *315*, 1243–1249.
- Daroles, L., Gribaudo, S., Doulazmi, M., Scotto-Lomassese, S., Dubacq, C., Mandairon, N., Greer, C.A., Didier, A., Trembleau, A., and Caillé, I. (2016). Fragile X Mental Retardation Protein and Dendritic Local Translation of the Alpha Subunit of the Calcium/Calmodulin-Dependent Kinase II Messenger RNA Are Required for the Structural Plasticity Underlying Olfactory Learning. *Biol. Psychiatry* *80*, 149–159.
- David, L.S., Schachner, M., and Saghatelian, A. (2013). The Extracellular Matrix Glycoprotein Tenascin-R Affects Adult But Not Developmental Neurogenesis in the Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* *33*, 10324–10339.
- De Rasmio, D., Signorile, A., Santeramo, A., Larizza, M., Lattanzio, P., Capitanio, G., and Papa, S. (2015). Intramitochondrial adenylyl cyclase controls the turnover of nuclear-encoded subunits and activity of mammalian complex I of the respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta* *1853*, 183–191.
- Delling, M., Indzhykulyan, A.A., Liu, X., Liu, Y., Xie, T., Corey, D.P., and Clapham, D.E. (2016). Primary Cilia Are Not Calcium-Responsive Mechanosensors. *Nature* *531*, 656–660.

- Dobyns, W.B., Andermann, E., Andermann, F., Czapansky-Beilman, D., Dubeau, F., Dulac, O., Guerrini, R., Hirsch, B., Ledbetter, D.H., Lee, N.S., et al. (1996). X-linked malformations of neuronal migration. *Neurology* 47, 331–339.
- Doetsch, F. (2003). A niche for adult neural stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 543–550.
- Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. *Cell* 97, 703–716.
- Emsley, J.G., and Hagg, T. (2003). $\alpha 6 \beta 1$ integrin directs migration of neuronal precursors in adult mouse forebrain. *Exp. Neurol.* 183, 273–285.
- Farrell, M.A., DeRosa, M.J., Curran, J.G., Secor, D.L., Cornford, M.E., Comair, Y.G., Peacock, W.J., Shields, W.D., and Vinters, H.V. (1992). Neuropathologic findings in cortical resections (including hemispherectomies) performed for the treatment of intractable childhood epilepsy. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 83, 246–259.
- Fasolo, A., Peretto, P., and Bonfanti, L. (2002). Cell migration in the rostral migratory stream. *Chem. Senses* 27, 581–582.
- Fink, A.J., Englund, C., Daza, R.A.M., Pham, D., Lau, C., Nivison, M., Kowalczyk, T., and Hevner, R.F. (2006). Development of the deep cerebellar nuclei: transcription factors and cell migration from the rhombic lip. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 3066–3076.
- Flock, A., and Duvall, A.J. (1965). THE ULTRASTRUCTURE OF THE KINOCILIUM OF THE SENSORY CELLS IN THE INNER EAR AND LATERAL LINE ORGANS. *J. Cell Biol.* 25, 1–8.
- Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M.C., Friocourt, G., McDonnell, N., Reiner, O., Kahn, A., et al. (1999). Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* 23, 247–256.
- Friedländer, M., and Wahrman, J. (1970). The spindle as a basal body distributor. A study in the meiosis of the male silkworm moth, *Bombyx mori*. *J. Cell Sci.* 7, 65–89.
- García-González, D., Murcia-Belmonte, V., Esteban, P.F., Ortega, F., Díaz, D., Sánchez-Vera, I., Lebrón-Galán, R., Escobar-Castañondo, L., Martínez-Millán, L., Weruaga, E., et al. (2016). Anosmin-1 over-expression increases adult neurogenesis in the subventricular zone and neuroblast migration to the olfactory bulb. *Brain Struct. Funct.* 221, 239–260.

- García-González, D., Khodosevich, K., Watanabe, Y., Rollenhagen, A., Lübke, J.H.R., and Monyer, H. (2017). Serotonergic Projections Govern Postnatal Neuroblast Migration. *Neuron* 94, 534–549.e9.
- Gdalyahu, A., Ghosh, I., Levy, T., Sapir, T., Sapoznik, S., Fishler, Y., Azoulai, D., and Reiner, O. (2004). DCX, a new mediator of the JNK pathway. *EMBO J.* 23, 823–832.
- Gleeson, J.G., Allen, K.M., Fox, J.W., Lamperti, E.D., Berkovic, S., Scheffer, I., Cooper, E.C., Dobyns, W.B., Minnerath, S.R., Ross, M.E., et al. (1998). Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* 92, 63–72.
- Goetz, S.C., and Anderson, K.V. (2010). The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat. Rev. Genet.* 11, 331–344.
- Guemez-Gamboa, A., Coufal, N.G., and Gleeson, J.G. (2014). Primary cilia in the developing and mature brain. *Neuron* 82, 511–521.
- Guo, J., Higginbotham, H., Li, J., Nichols, J., Hirt, J., Ghukasyan, V., and Anton, E.S. (2015). Developmental disruptions underlying brain abnormalities in ciliopathies. *Nat. Commun.* 6.
- Guo, J., Otis, J.M., Higginbotham, H., Monckton, C., Cheng, J., Asokan, A., Mykytyn, K., Caspary, T., Stuber, G.D., and Anton, E.S. (2017). Primary Cilia Signaling Shapes the Development of Interneuronal Connectivity. *Dev. Cell* 42, 286–300.e4.
- Hamers, D., van Voorst Vader, L., Borst, J.W., and Goedhart, J. (2014). Development of FRET biosensors for mammalian and plant systems. *Protoplasma* 251, 333–347.
- Han, Y.-G., Spassky, N., Romaguera-Ros, M., Garcia-Verdugo, J.-M., Aguilar, A., Schneider-Maunoury, S., and Alvarez-Buylla, A. (2008). Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat. Neurosci.* 11, 277–284.
- Händel, M., Schulz, S., Stanarius, A., Schreff, M., Erdtmann-Vourliotis, M., Schmidt, H., Wolf, G., and Höllt, V. (1999). Selective targeting of somatostatin receptor 3 to neuronal cilia. *Neuroscience* 89, 909–926.
- Hanics, J., Szodorai, E., Tortoriello, G., Malenczyk, K., Keimpema, E., Lubec, G., Hevesi, Z., Lutz, M.I., Kozsurek, M., Puskár, Z., et al. (2017). Secretagogen-dependent matrix metalloprotease-2 release from neurons regulates neuroblast migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E2006–E2015.
- Hatten, M.E. (1999). Central nervous system neuronal migration. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 511–539.

- Higginbotham, H., Tanaka, T., Brinkman, B.C., and Gleeson, J.G. (2006). GSK3beta and PKCzeta function in centrosome localization and process stabilization during Slit-mediated neuronal repolarization. *Mol. Cell. Neurosci.* 32, 118–132.
- Higginbotham, H., Eom, T.-Y., Mariani, L.E., Bachleda, A., Gukassyan, V., Hirt, J., Cusack, C., Lai, C., Caspary, T., and Anton, E.S. (2012a). Arl13b in primary cilia regulates the migration and placement of interneurons in the developing cerebral cortex. *Dev. Cell* 23, 925–938.
- Higginbotham, H., Eom, T.-Y., Mariani, L.E., Bachleda, A., Hirt, J., Gukassyan, V., Cusack, C.L., Lai, C., Caspary, T., and Anton, E.S. (2012b). Arl13b in Primary Cilia Regulates the Migration and Placement of Interneurons in the Developing Cerebral Cortex. *Dev. Cell* 23, 925–938.
- Higginbotham, H., Guo, J., Yokota, Y., Umberger, N.L., Su, C.-Y., Li, J., Verma, N., Hirt, J., Ghukasyan, V., Caspary, T., et al. (2013). Arl13b-regulated cilia activities are essential for polarized radial glial scaffold formation. *Nat. Neurosci.* 16, 1000–1007.
- Hildebrandt, F., Benzing, T., and Katsanis, N. (2011). Ciliopathies. *N. Engl. J. Med.* 364, 1533–1543.
- Hirota, Y., Ohshima, T., Kaneko, N., Ikeda, M., Iwasato, T., Kulkarni, A.B., Mikoshiba, K., Okano, H., and Sawamoto, K. (2007). Cyclin-dependent kinase 5 is required for control of neuroblast migration in the postnatal subventricular zone. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 12829–12838.
- Hirotsune, S., Fleck, M.W., Gambello, M.J., Bix, G.J., Chen, A., Clark, G.D., Ledbetter, D.H., McBain, C.J., and Wynshaw-Boris, A. (1998). Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nat. Genet.* 19, 333–339.
- Hu, D.J.-K., Baffet, A.D., Nayak, T., Akhmanova, A., Doye, V., and Vallee, R.B. (2013). Dynein recruitment to nuclear pores activates apical nuclear migration and mitotic entry in brain progenitor cells. *Cell* 154, 1300–1313.
- Hu, H., Tomasiewicz, H., Magnuson, T., and Rutishauser, U. (1996). The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron* 16, 735–743.
- Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A.S., Murcia, N.S., Niswander, L., and Anderson, K.V. (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 426, 83–87.

- Ihrle, R.A., and Álvarez-Buylla, A. (2011). Lake-Front Property: A Unique Germinal Niche by the Lateral Ventricles of the Adult Brain. *Neuron* 70, 674–686.
- Jiang, J.Y., Falcone, J.L., Curci, S., and Hofer, A.M. (2017). Interrogating cyclic AMP signaling using optical approaches. *Cell Calcium* 64, 47–56.
- Kappeler, C., Saillour, Y., Baudoin, J.-P., Tuy, F.P.D., Alvarez, C., Houbon, C., Gaspar, P., Hamard, G., Chelly, J., Métin, C., et al. (2006). Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from doublecortin knockout mice. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1387–1400.
- Kasahara, K., Miyoshi, K., Murakami, S., Miyazaki, I., and Asanuma, M. (2014). Visualization of astrocytic primary cilia in the mouse brain by immunofluorescent analysis using the cilia marker Arl13b. *Acta Med. Okayama* 68, 317–322.
- Kato, M., and Dobyns, W.B. (2003). Lissencephaly and the molecular basis of neuronal migration. *Hum. Mol. Genet.* 12 *Spec No 1*, R89-96.
- Kawasaki, H., Springett, G.M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D.E., and Graybiel, A.M. (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282, 2275–2279.
- Kessenbrock, K., Plaks, V., and Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141, 52–67.
- Kishi, K. (1987). Golgi studies on the development of granule cells of the rat olfactory bulb with reference to migration in the subependymal layer. *J. Comp. Neurol.* 258, 112–124.
- Klarenbeek, J., Goedhart, J., van Batenburg, A., Groenewald, D., and Jalink, K. (2015). Fourth-generation epac-based FRET sensors for cAMP feature exceptional brightness, photostability and dynamic range: characterization of dedicated sensors for FLIM, for ratiometry and with high affinity. *PloS One* 10, e0122513.
- Koemeter-Cox, A.I., Sherwood, T.W., Green, J.A., Steiner, R.A., Berbari, N.F., Yoder, B.K., Kauffman, A.S., Monsma, P.C., Brown, A., Askwith, C.C., et al. (2014). Primary cilia enhance kisspeptin receptor signaling on gonadotropin-releasing hormone neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 10335–10340.
- Koizumi, H., Higginbotham, H., Poon, T., Tanaka, T., Brinkman, B.C., and Gleeson, J.G. (2006). Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain. *Nat. Neurosci.* 9, 779–786.
- Kozminski, K.G., Johnson, K.A., Forscher, P., and Rosenbaum, J.L. (1993). A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5519–5523.

- Kriegstein, A.R., and Noctor, S.C. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.* 27, 392–399.
- Kumamoto, N., Gu, Y., Wang, J., Janoschka, S., Takemaru, K.-I., Levine, J., and Ge, S. (2012). A role for primary cilia in glutamatergic synaptic integration of adult-born neurons. *Nat. Neurosci.* 15, 399–405.
- Kurlemann, G., Schuierer, G., Kuchelmeister, K., Kleine, M., Weglage, J., and Palm, D.G. (1993). Lissencephaly syndromes: clinical aspects. *Childs Nerv. Syst. ChNS Off. J. Int. Soc. Pediatr. Neurosurg.* 9, 380–386.
- LaFountain, J.R. (1976). Analysis of birefringence and ultrastructure of spindles in primary spermatocytes of *Nephrotoma suturalis* during anaphase. *J. Ultrastruct. Res.* 54, 333–346.
- Leaf, A., and Von Zastrow, M. (2015). Dopamine receptors reveal an essential role of IFT-B, KIF17, and Rab23 in delivering specific receptors to primary cilia. *ELife* 4.
- Leclech, C., Renner, M., Villard, C., and Métin, C. (2019). Topographical cues control the morphology and dynamics of migrating cortical interneurons. *Biomaterials* 214, 119194.
- Lehman, J.M., Michaud, E.J., Schoeb, T.R., Aydin-Son, Y., Miller, M., and Yoder, B.K. (2008). The Oak Ridge Polycystic Kidney mouse: modeling ciliopathies of mice and men. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 237, 1960–1971.
- Leopold, A.V., Chernov, K.G., and Verkhusha, V.V. (2018). Optogenetically controlled protein kinases for regulation of cellular signaling. *Chem. Soc. Rev.* 47, 2454–2484.
- Lepanto, P., Badano, J.L., and Zolessi, F.R. (2016). Neuron’s little helper: The role of primary cilia in neurogenesis. *Neurogenesis Austin Tex* 3, e1253363.
- Leto, K., Arancillo, M., Becker, E.B.E., Buffo, A., Chiang, C., Ding, B., Dobyns, W.B., Dusart, I., Haldipur, P., Hatten, M.E., et al. (2016). Consensus Paper: Cerebellar Development. *Cerebellum Lond. Engl.* 15, 789–828.
- Lim, D.A., and Alvarez-Buylla, A. (2016). The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8.
- Lois, C., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271, 978–981.
- Loktev, A.V., and Jackson, P.K. (2013). Neuropeptide Y family receptors traffic via the Bardet-Biedl syndrome pathway to signal in neuronal primary cilia. *Cell Rep.* 5, 1316–1329.

- Luskin, M.B. (1998). Neuroblasts of the postnatal mammalian forebrain: their phenotype and fate. *J. Neurobiol.* 36, 221–233.
- Mackay-Sima, A., and Chuahb, M.I. (2000). Neurotrophic factors in the primary olfactory pathway. *Prog. Neurobiol.* 62, 527–559.
- Maiellaro, I., Lohse, M.J., Kittel, R.J., and Calebiro, D. (2016). cAMP Signals in *Drosophila* Motor Neurons Are Confined to Single Synaptic Boutons. *Cell Rep.* 17, 1238–1246.
- Marín, O., and Rubenstein, J.L. (2001). A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 780–790.
- Marín, O., and Rubenstein, J.L.R. (2003). Cell migration in the forebrain. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 441–483.
- Marín, O., Valiente, M., Ge, X., and Tsai, L.-H. (2010). Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001834.
- Marley, A., and von Zastrow, M. (2010). DISC1 regulates primary cilia that display specific dopamine receptors. *PloS One* 5, e10902.
- Marszalek, J.R., Ruiz-Lozano, P., Roberts, E., Chien, K.R., and Goldstein, L.S. (1999). Situs inversus and embryonic ciliary morphogenesis defects in mouse mutants lacking the KIF3A subunit of kinesin-II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 5043–5048.
- Martínez-Martínez, M.Á., Ciceri, G., Espinós, A., Fernández, V., Marín, O., and Borrell, V. (2019). Extensive branching of radially-migrating neurons in the mammalian cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 527, 1558–1576.
- Martini, F.J., and Valdeolmillos, M. (2010). Actomyosin contraction at the cell rear drives nuclear translocation in migrating cortical interneurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 8660–8670.
- Martini, F.J., Valiente, M., López Bendito, G., Szabó, G., Moya, F., Valdeolmillos, M., and Marín, O. (2009). Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. *Dev. Camb. Engl.* 136, 41–50.
- Matsuno, R., Ohtaki, H., Nakamachi, T., Watanabe, J., Yofu, S., Hayashi, D., Takeda, T., Nonaka, N., Seki, M., Nakamura, M., et al. (2008). Distribution and localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-specific receptor (PAC1R) in the rostral migratory stream of the infant mouse brain. *Regul. Pept.* 145, 80–87.
- Matulef, K., and Zagotta, W.N. (2003). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 23–44.

- McManus, M.F., Nasrallah, I.M., Pancoast, M.M., Wynshaw-Boris, A., and Golden, J.A. (2004). *Lis1* Is Necessary for Normal Non-Radial Migration of Inhibitory Interneurons. *Am. J. Pathol.* *165*, 775–784.
- Mei, D., Lewis, R., Parrini, E., Lazarou, L.P., Marini, C., Pilz, D.T., and Guerrini, R. (2008). High frequency of genomic deletions--and a duplication--in the *LIS1* gene in lissencephaly: implications for molecular diagnosis. *J. Med. Genet.* *45*, 355–361.
- Métin, C. (2014). Cils et migrations neuronales. *Médecine/Sciences* *30*, 991–995.
- Milenkovic, L., Scott, M.P., and Rohatgi, R. (2009). Lateral transport of Smoothed from the plasma membrane to the membrane of the cilium. *J. Cell Biol.* *187*, 365–374.
- Ming, G.L., Song, H.J., Berninger, B., Holt, C.E., Tessier-Lavigne, M., and Poo, M.M. (1997). cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron* *19*, 1225–1235.
- Miyamoto, T., Porazinski, S., Wang, H., Borovina, A., Ciruna, B., Shimizu, A., Kajii, T., Kikuchi, A., Furutani-Seiki, M., and Matsuura, S. (2011). Insufficiency of BUBR1, a mitotic spindle checkpoint regulator, causes impaired ciliogenesis in vertebrates. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 2058–2070.
- Miyata, T., Ono, Y., Okamoto, M., Masaoka, M., Sakakibara, A., Kawaguchi, A., Hashimoto, M., and Ogawa, M. (2010). Migration, early axonogenesis, and Reelin-dependent layer-forming behavior of early/posterior-born Purkinje cells in the developing mouse lateral cerebellum. *Neural Develop.* *5*, 23.
- Mizuguchi, M., Takashima, S., Kakita, A., Yamada, M., and Ikeda, K. (1995). Lissencephaly gene product. Localization in the central nervous system and loss of immunoreactivity in Miller-Dieker syndrome. *Am. J. Pathol.* *147*, 1142–1151.
- Moore, B.S., Stepanchick, A.N., Tewson, P.H., Hartle, C.M., Zhang, J., Quinn, A.M., Hughes, T.E., and Mirshahi, T. (2016). Cilia have high cAMP levels that are inhibited by Sonic Hedgehog-regulated calcium dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 13069–13074.
- Moore, C.A., Perderiset, M., Francis, F., Chelly, J., Houdusse, A., and Milligan, R.A. (2004). Mechanism of microtubule stabilization by doublecortin. *Mol. Cell* *14*, 833–839.
- Moyer, J.H., Lee-Tischler, M.J., Kwon, H.Y., Schrick, J.J., Avner, E.D., Sweeney, W.E., Godfrey, V.L., Cacheiro, N.L., Wilkinson, J.E., and Woychik, R.P. (1994). Candidate gene associated with a mutation causing recessive polycystic kidney disease in mice. *Science* *264*, 1329–1333.

- Murase, S., and Horwitz, A.F. (2002). Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 3568–3579.
- Musheshe, N., Schmidt, M., and Zaccolo, M. (2018). cAMP: From Long-Range Second Messenger to Nanodomain Signalling. *Trends Pharmacol. Sci.* 39, 209–222.
- Nag, S., and Resnick, A. (2017). Biophysics and biofluid dynamics of primary cilia: evidence for and against the flow-sensing function. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 313, F706–F720.
- Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Picard-Riera, N., Tessier-Lavigne, M., Evercooren, A.B.-V., Sotelo, C., and Chédotal, A. (2004). Multiple Roles for Slits in the Control of Cell Migration in the Rostral Migratory Stream. *J. Neurosci.* 24, 1497–1506.
- Nicol, X., Hong, K.P., and Spitzer, N.C. (2011). Spatial and temporal second messenger codes for growth cone turning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13776–13781.
- Ocbina, P.J., Dizon, M.L.V., Shin, L., and Szele, F.G. (2006). Doublecortin is necessary for the migration of adult subventricular zone cells from neurospheres. *Mol. Cell. Neurosci.* 33, 126–135.
- Omori, K., and Kotera, J. (2007). Overview of PDEs and their regulation. *Circ. Res.* 100, 309–327.
- Omori, Y., Chaya, T., Yoshida, S., Irie, S., Tsujii, T., and Furukawa, T. (2015). Identification of G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) in Primary Cilia and Their Possible Involvement in Body Weight Control. *PloS One* 10, e0128422.
- Ota, H., Hikita, T., Sawada, M., Nishioka, T., Matsumoto, M., Komura, M., Ohno, A., Kamiya, Y., Miyamoto, T., Asai, N., et al. (2014). Speed control for neuronal migration in the postnatal brain by Gmip-mediated local inactivation of RhoA. *Nat. Commun.* 5, 4532.
- Pal, K., and Mukhopadhyay, S. (2015). Primary cilium and sonic hedgehog signaling during neural tube patterning: role of GPCRs and second messengers. *Dev. Neurobiol.* 75, 337–348.
- Palay, S.L. (1960). The fine structure of secretory neurons in the preoptic nucleus of the goldfish (*Carassius auratus*). *Anat. Rec.* 138, 417–443.
- Paredes, M.F., James, D., Gil-Perotin, S., Kim, H., Cotter, J.A., Ng, C., Sandoval, K., Rowitch, D.H., Xu, D., McQuillen, P.S., et al. (2016). Extensive migration of young neurons into the infant human frontal lobe. *Science* 354.

- Paredes, M.F., Sorrells, S.F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K.W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K.I., et al. (2018). Does Adult Neurogenesis Persist in the Human Hippocampus? *Cell Stem Cell* 23, 780–781.
- Pearring, J.N., Salinas, R.Y., Baker, S.A., and Arshavsky, V.Y. (2013). Protein sorting, targeting and trafficking in photoreceptor cells. *Prog. Retin. Eye Res.* 36, 24–51.
- Pedersen, L.B., Veland, I.R., Schröder, J.M., and Christensen, S.T. (2008). Assembly of primary cilia. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 237, 1993–2006.
- Peretto, P., Giachino, C., Aimar, P., Fasolo, A., and Bonfanti, L. (2005). Chain formation and glial tube assembly in the shift from neonatal to adult subventricular zone of the rodent forebrain. *J. Comp. Neurol.* 487, 407–427.
- Peteanu, L., and Alvarez-Buylla, A. (2002). Maturation and Death of Adult-Born Olfactory Bulb Granule Neurons: Role of Olfaction. *J. Neurosci.* 22, 6106–6113.
- Piggott, L.A., Bauman, A.L., Scott, J.D., and Dessauer, C.W. (2008). The A-kinase anchoring protein Yotiao binds and regulates adenylyl cyclase in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13835–13840.
- des Portes, V., Pinard, J.M., Billuart, P., Vinet, M.C., Koulakoff, A., Carrié, A., Gelot, A., Dupuis, E., Motte, J., Berwald-Netter, Y., et al. (1998). A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell* 92, 51–61.
- Praetorius, H.A., and Spring, K.R. (2005). A physiological view of the primary cilium. *Annu. Rev. Physiol.* 67, 515–529.
- Qin, H., Burnette, D.T., Bae, Y.-K., Forscher, P., Barr, M.M., and Rosenbaum, J.L. (2005). Intraflagellar transport is required for the vectorial movement of TRPV channels in the ciliary membrane. *Curr. Biol. CB* 15, 1695–1699.
- Quiquempoix, M., Fayad, S.L., Boutourlinsky, K., Leresche, N., Lambert, R.C., and Bessaih, T. (2018). Layer 2/3 Pyramidal Neurons Control the Gain of Cortical Output. *Cell Rep.* 24, 2799-2807.e4.
- Rahimi-Balaei, M., Bergen, H., Kong, J., and Marzban, H. (2018). Neuronal Migration During Development of the Cerebellum. *Front. Cell. Neurosci.* 12.
- Reiner, O., and Sapiro, T. (2009). Polarity regulation in migrating neurons in the cortex. *Mol. Neurobiol.* 40, 1–14.
- Rivas, R.J., and Hatten, M.E. (1995). Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 981–989.

- Roisen, F.J., Murphy, R.A., Pichichero, M.E., and Braden, W.G. (1972). Cyclic adenosine monophosphate stimulation of axonal elongation. *Science* 175, 73–74.
- Rosenbaum, J.L., and Witman, G.B. (2002). Intraflagellar transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 813–825.
- Rousselot, P., and Nottebohm, F. (1995). Expression of polysialylated N-CAM in the central nervous system of adult canaries and its possible relation to function. *J. Comp. Neurol.* 356, 629–640.
- Saade, M., Gonzalez-Gobartt, E., Escalona, R., Usieto, S., and Martí, E. (2017). Shh-mediated centrosomal recruitment of PKA promotes symmetric proliferative neuroepithelial cell division. *Nat. Cell Biol.* 19, 493–503.
- Sanai, N., Tramontin, A.D., Quiñones-Hinojosa, A., Barbaro, N.M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M.T., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Manuel-García Verdugo, J., et al. (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427, 740–744.
- Sanai, N., Berger, M.S., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2007). Comment on “Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension.” *Science* 318, 393; author reply 393.
- Sanai, N., Nguyen, T., Ihrie, R.A., Mirzadeh, Z., Tsai, H.-H., Wong, M., Gupta, N., Berger, M.S., Huang, E., Garcia-Verdugo, J.-M., et al. (2011). Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* 478, 382–386.
- Sapir, T., Elbaum, M., and Reiner, O. (1997). Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *EMBO J.* 16, 6977–6984.
- Satir, P., and Christensen, S.T. (2007). Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 377–400.
- Sawamoto, K., Wichterle, H., Gonzalez-Perez, O., Cholfín, J.A., Yamada, M., Spassky, N., Murcia, N.S., Garcia-Verdugo, J.M., Marin, O., Rubenstein, J.L.R., et al. (2006). New Neurons Follow the Flow of Cerebrospinal Fluid in the Adult Brain. *Science* 311, 629–632.
- Schaar, B.T., and McConnell, S.K. (2005). Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 13652–13657.
- Schaar, B.T., Kinoshita, K., and McConnell, S.K. (2004). Doublecortin microtubule affinity is regulated by a balance of kinase and phosphatase activity at the leading edge of migrating neurons. *Neuron* 41, 203–213.

- Schneider, L., Clement, C.A., Teilmann, S.C., Pazour, G.J., Hoffmann, E.K., Satir, P., and Christensen, S.T. (2005). PDGFR α signaling is regulated through the primary cilium in fibroblasts. *Curr. Biol.* *15*, 1861–1866.
- Schneider, L., Stock, C.-M., Dieterich, P., Jensen, B.H., Pedersen, L.B., Satir, P., Schwab, A., Christensen, S.T., and Pedersen, S.F. (2009). The Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 is required for directional migration stimulated via PDGFR- α in the primary cilium. *J. Cell Biol.* *185*, 163–176.
- Schneider, L., Cammer, M., Lehman, J., Nielsen, S.K., Guerra, C.F., Veland, I.R., Stock, C., Hoffmann, E.K., Yoder, B.K., Schwab, A., et al. (2010). Directional Cell Migration and Chemotaxis in Wound Healing Response to PDGF-AA are Coordinated by the Primary Cilium in Fibroblasts. *Cell. Physiol. Biochem.* *25*, 279–292.
- Scholey, J.M. (1996). Kinesin-II, a membrane traffic motor in axons, axonemes, and spindles. *J. Cell Biol.* *133*, 1–4.
- Schou, K.B., Pedersen, L.B., and Christensen, S.T. (2015). Ins and outs of GPCR signaling in primary cilia. *EMBO Rep.* *16*, 1099–1113.
- Schwartz, E.A., Leonard, M.L., Bizios, R., and Bowser, S.S. (1997). Analysis and modeling of the primary cilium bending response to fluid shear. *Am. J. Physiol.* *272*, F132–138.
- Shelly, M., Lim, B.K., Cancedda, L., Heilshorn, S.C., Gao, H., and Poo, M. (2010). Local and long-range reciprocal regulation of cAMP and cGMP in axon/dendrite formation. *Science* *327*, 547–552.
- Sherpa, R.T., Mohieldin, A.M., Pala, R., Wachten, D., Ostrom, R.S., and Nauli, S.M. (2019). Sensory primary cilium is a responsive cAMP microdomain in renal epithelia. *Sci. Rep.* *9*, 6523.
- Shewan, D., Dwivedy, A., Anderson, R., and Holt, C.E. (2002). Age-related changes underlie switch in netrin-1 responsiveness as growth cones advance along visual pathway. *Nat. Neurosci.* *5*, 955–962.
- Shinohara, R., Thumkeo, D., Kamijo, H., Kaneko, N., Sawamoto, K., Watanabe, K., Takebayashi, H., Kiyonari, H., Ishizaki, T., Furuyashiki, T., et al. (2012). A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in tangential migration of interneuron precursors. *Nat. Neurosci.* *15*, 373–380, S1–2.
- Shu, T., Ayala, R., Nguyen, M.-D., Xie, Z., Gleeson, J.G., and Tsai, L.-H. (2004). Ndel1 operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning. *Neuron* *44*, 263–277.

- Snappyan, M., Lemasson, M., Brill, M.S., Blais, M., Massouh, M., Ninkovic, J., Gravel, C., Berthod, F., Götz, M., Barker, P.A., et al. (2009). Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 4172–4188.
- Solecki, D.J., Model, L., Gaetz, J., Kapoor, T.M., and Hatten, M.E. (2004). Par6 α signaling controls glial-guided neuronal migration. *Nat. Neurosci.* 7, 1195.
- Sorokin, S. (1962). Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 15, 363–377.
- Sorokin, S.P. (1968). Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *J. Cell Sci.* 3, 207–230.
- Sotelo, J.R., and Trujillo-Cenoz, O. (1958). Electron microscope study on the development of ciliary components of the neural epithelium of the chick embryo. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. Vienna Austria* 1948 49, 1–12.
- Spiegelman, B.M., Lopata, M.A., and Kirschner, M.W. (1979). Multiple sites for the initiation of microtubule assembly in mammalian cells. *Cell* 16, 239–252.
- Suijkerbuijk, S.J.E., van Osch, M.H.J., Bos, F.L., Hanks, S., Rahman, N., and Kops, G.J.P.L. (2010). Molecular causes for BUBR1 dysfunction in the human cancer predisposition syndrome mosaic variegated aneuploidy. *Cancer Res.* 70, 4891–4900.
- Sun, W., Kim, H., and Moon, Y. (2010). Control of neuronal migration through rostral migratory stream in mice. *Anat. Cell Biol.* 43, 269–279.
- Tabata, H., and Nakajima, K. (2003). Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 9996–10001.
- Tanaka, T., Serneo, F.F., Higgins, C., Gambello, M.J., Wynshaw-Boris, A., and Gleeson, J.G. (2004). Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *J. Cell Biol.* 165, 709–721.
- Tartt, A.N., Fulmore, C.A., Liu, Y., Rosoklija, G.B., Dwork, A.J., Arango, V., Hen, R., Mann, J.J., and Boldrini, M. (2018). Considerations for Assessing the Extent of Hippocampal Neurogenesis in the Adult and Aging Human Brain. *Cell Stem Cell* 23, 782–783.
- Taylor, S.S., Zhang, P., Steichen, J.M., Keshwani, M.M., and Kornev, A.P. (2013). PKA: lessons learned after twenty years. *Biochim. Biophys. Acta* 1834, 1271–1278.
- Terrin, A., Di Benedetto, G., Pertegato, V., Cheung, Y.-F., Baillie, G., Lynch, M.J., Elvassore, N., Prinz, A., Herberg, F.W., Houslay, M.D., et al. (2006). PGE(1)

- stimulation of HEK293 cells generates multiple contiguous domains with different [cAMP]: role of compartmentalized phosphodiesterases. *J. Cell Biol.* *175*, 441–451.
- Terrin, A., Monterisi, S., Stangherlin, A., Zoccarato, A., Koschinski, A., Surdo, N.C., Mongillo, M., Sawa, A., Jordanides, N.E., Mountford, J.C., et al. (2012). PKA and PDE4D3 anchoring to AKAP9 provides distinct regulation of cAMP signals at the centrosome. *J. Cell Biol.* *198*, 607–621.
- Tong, C.K., Han, Y.-G., Shah, J.K., Obernier, K., Guinto, C.D., and Alvarez-Buylla, A. (2014). Primary cilia are required in a unique subpopulation of neural progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 12438–12443.
- Toriyama, M., Mizuno, N., Fukami, T., Iguchi, T., Toriyama, M., Tago, K., and Itoh, H. (2012). Phosphorylation of Doublecortin by Protein Kinase A Orchestrates Microtubule and Actin Dynamics to Promote Neuronal Progenitor Cell Migration. *J. Biol. Chem.* *287*, 12691–12702.
- Tsai, L.-H., and Gleeson, J.G. (2005). Nucleokinesis in Neuronal Migration. *Neuron* *46*, 383–388.
- Tsai, J.-W., Bremner, K.H., and Vallee, R.B. (2007). Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue. *Nat. Neurosci.* *10*, 970–979.
- Tsukada, M., Prokscha, A., Ungewickell, E., and Eichele, G. (2005). Doublecortin association with actin filaments is regulated by neurabin II. *J. Biol. Chem.* *280*, 11361–11368.
- Tsukada, M., Prokscha, A., and Eichele, G. (2006). Neurabin II mediates doublecortin-dephosphorylation on actin filaments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *343*, 839–847.
- Umeshima, H., Hirano, T., and Kengaku, M. (2007). Microtubule-based nuclear movement occurs independently of centrosome positioning in migrating neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 16182–16187.
- Vaudry, D., Gonzalez, B.J., Basille, M., Fournier, A., and Vaudry, H. (1999). Neurotrophic activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 9415–9420.
- Veland, I.R., Lindbæk, L., and Christensen, S.T. (2014). Linking the Primary Cilium to Cell Migration in Tissue Repair and Brain Development. *BioScience* *64*, 1115–1125.
- Vierkotten, J., Dildrop, R., Peters, T., Wang, B., and Rütther, U. (2007). Ftm is a novel basal body protein of cilia involved in Shh signalling. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 2569–2577.
- Wefers, A.K., Haberlandt, C., Surchev, L., Steinhäuser, C., Jabs, R., and Schilling, K. (2018). Migration of Interneuron Precursors in the Nascent Cerebellar Cortex. *Cerebellum Lond. Engl.* *17*, 62–71.

- Wheatley, D.N., Wang, A.M., and Strugnelli, G.E. (1996). Expression of Primary Cilia in Mammalian Cells. *Cell Biol. Int.* 20, 73–81.
- Wichterle, H., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Direct Evidence for Homotypic, Glia-Independent Neuronal Migration. *Neuron* 18, 779–791.
- Willoughby, D., and Cooper, D.M.F. (2008). Live-cell imaging of cAMP dynamics. *Nat. Methods* 5, 29–36.
- Winters, S.J., and Moore, J.P. (2011). PACAP, an autocrine/paracrine regulator of gonadotrophs. *Biol. Reprod.* 84, 844–850.
- Wittko, I.M., Schänzer, A., Kuzmichev, A., Schneider, F.T., Shibuya, M., Raab, S., and Plate, K.H. (2009). VEGFR-1 regulates adult olfactory bulb neurogenesis and migration of neural progenitors in the rostral migratory stream in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 8704–8714.
- Wong, K., Ren, X.R., Huang, Y.Z., Xie, Y., Liu, G., Saito, H., Tang, H., Wen, L., Brady-Kalnay, S.M., Mei, L., et al. (2001). Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell* 107, 209–221.
- Xie, Z., Sanada, K., Samuels, B.A., Shih, H., and Tsai, L.H. (2003). Serine 732 phosphorylation of FAK by Cdk5 is important for microtubule organization, nuclear movement, and neuronal migration. *Cell* 114, 469–482.
- Yagita, Y., Sakurai, T., Tanaka, H., Kitagawa, K., Colman, D.R., and Shan, W. (2009). N-cadherin mediates interaction between precursor cells in the subventricular zone and regulates further differentiation. *J. Neurosci. Res.* 87, 3331–3342.
- Yuasa, S., Kawamura, K., Kuwano, R., and Ono, K. (1996). Neuron-glia interrelations during migration of Purkinje cells in the mouse embryonic cerebellum. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 14, 429–438.
- Zaccolo, M. (2009). cAMP signal transduction in the heart: understanding spatial control for the development of novel therapeutic strategies. *Br. J. Pharmacol.* 158, 50–60.
- Zaccolo, M., and Pozzan, T. (2002). Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science* 295, 1711–1715.
- Zecevic, N., Chen, Y., and Filipovic, R. (2005). Contributions of Cortical Subventricular Zone to the Development of the Human Cerebral Cortex. *J. Comp. Neurol.* 491, 109–122.

Zippin, J.H., Chadwick, P.A., Levin, L.R., Buck, J., and Magro, C.M. (2010). Soluble adenylyl cyclase defines a nuclear cAMP microdomain in keratinocyte hyperproliferative skin diseases. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 1279–1287.