UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE

AIX-MARSEILLE II

Faculté des Sciences de Luminy

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE AIX-MARSEILLE II

Spécialité : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement par

Shirley BEGUIN

Le 16 décembre 2011

Titre :

« Conséquences physiopathologiques des mutations du gène ARX dans le développement cérébral ».

Jury :

Pr. André NIEOULLON, président

Dr. Christine METIN, rapporteur

Dr. Antoine DEPAULIS, rapporteur

Dr. Patrick COLLOMBAT, examinateur

Dr. Harold CREMER, examinateur

Dr. Alfonso REPRESA, directeur de thèse

Remerciements :

Cette thèse est le fruit de quatre années de travail au sein de l'Institut de Neurobiologie de la Méditerranée. Je remercie en premier lieu le Pr. Ben-Ari d'avoir fondé un tel laboratoire qui m'a permis de travailler dans d'excellentes conditions tant au niveau scientifique qu'humain.

Je tiens ensuite à remercier tous les membres du jury : Les Drs Christine Métin et Antoine Depaulis qui me font l'honneur d'être rapporteurs de ce travail, ainsi que les Drs Patrick Collombat et Harold Cremer d'avoir accepté d'être examinateurs. Je remercie chaleureusement le Pr. André Nieoullon d'avoir accepté de présider cette soutenance.

Je souhaite plus particulièrement remercier Alfonso Represa, mon directeur de thèse et directeur du laboratoire, pour sa gentillesse, sa bonne humeur, sa disponibilité malgré son emploi du temps bien chargé. Ses conseils, ses qualités scientifiques, et l'autonomie qu'il m'a laissé m'ont permis de grandir et de m'épanouir scientifiquement.

Merci à tous les membres de l'équipe Represa et plus particulièrement Isabel pour avoir aider « la petite » à ses débuts, Hélène pour toutes ces nombreuses heures passées à électroporer, Carlos pour son aide précieuse en biologie moléculaire et Jean-Bernard pour nos discussions scientifiques et non scientifiques ! Merci également à tous les membres de l'INMED qui ont contribué de près ou de loin à cet environnement scientifique et humain très agréable, et plus particulièrement Valérie et Laurent pour leur contribution électrophysiologique dans mon projet, et mon « roomate » préféré.

Une petite pensée pour « l'INMED team » sans qui ces quatre années n'auraient pas été aussi agréables : Karine, Thibault, Belkacem, Bahija, Anice, Jennifer, Fred...Avec une mention spéciale aux greluches : Perrinouche, Fabounette et Annele ! Une petite pensée aussi pour ma petite escalope qui est toujours là à mes côtés depuis toutes ces années, 19 ans déjà !

Un grand merci à mes parents d'être toujours présents pour moi. C'est aussi grâce à eux que j'en suis arrivée là, ils m'ont toujours épaulé et soutenu dans mes choix. Merci aussi à mes frères et mes belles sœurs qui font de mon environnement familial un vrai bonheur ! Une petite pensée aussi pour tous leurs petits bouts qui j'espère seront fiers de leur tata !

Je ne peux que finir ces remerciements par Laurent, qui me supporte quotidiennement, qui m'a aidé à me défouler, quand la science n'avançait pas, pendant ces longues soirées de travaux, qui m'épaule au quotidien, me réconforte, et qui est toujours là pour moi. Un grand merci à toi...

Résumé :

Des mutations du gène ARX (<u>a</u>ristaless-<u>r</u>elated homeobo<u>x</u> gene) ont été identifiées dans un large spectre de désordres neurologiques précoces, incluant ou non des malformations cérébrales, le plus souvent associés à des épilepsies. Il est proposé que le gène ARX, codant pour un facteur de transcription, joue un rôle primordial au cours du développement cérébral, notamment sur la migration des neurones GABAergiques, mais son implication au cours de la mise en place du système nerveux central reste cependant encore mal connue. L'objectif de ce travail a été d'étudier le rôle du gène ARX et les conséquences de ses mutations sur le développement cérébral dans le but d'expliquer et éventuellement de prévenir de telles pathologies.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet d'une mutation particulière du gène, la mutation ARX(GCG)7, une expansion polyalanine retrouvée principalement dans des pathologies sans malformation cérébrale mais avec des épilepsies, tels que les syndromes de West ou d'Ohtahara. Des analyses réalisées sur une lignée de souris knock-in pour cette mutation (GCG)7 et sur des rats après électroporation *in utero* ont montré que la migration neuronale des neurones glutamatergiques et GABAergiques ainsi que la maturation des neurones GABAergiques ne sont pas altérées par cette mutation. De façon intéressante, nos données suggèrent que les épilepsies observées chez les souris knock-in résulteraient plutôt d'une réorganisation du réseau glutamatergiques, l'ensemble de ce travail suggère que les épilepsies chez les souris knock-in pour la mutation (GCG)7 sont la conséquence d'une altération développementale secondaire à la mutation initiale du gène, et ceci aurait d'importantes répercussions thérapeutiques qui requièrent d'avantages d'études.

Des expériences préliminaires nous ont ensuite permis d'étudier l'effet de plusieurs mutations du gène ARX sur la morphologie des interneurones *in vitro*. Celles-ci ont montré que les mutations d'ARX n'engendrent pas une localisation subcellulaire anormale de la protéine dans les interneurones en culture. De façon intéressante, ces expériences suggèrent que la morphologie des interneurones est altérée seulement par certaines mutations. Ces données préliminaires soulignent ainsi l'importance d'étudier de façon spécifique chaque mutation du gène pour expliquer les mécanismes engendrant l'hétérogénéité phénotypique liée aux mutations d'ARX.

L'ensemble de ces travaux contribuent à une meilleure compréhension du rôle du gène ARX dans le développement cortical et à une meilleure caractérisation des mécanismes physiopathologiques des désordres neurologiques précoces liés aux mutations de ce gène.

Table des matières :

Avant propos	1
INTRODUCTION	2
I/ Développement du cortex cérébral	2
A. Généralités	2
B. Génération et mise en place des neurones du cortex cérébral	3
1. Mise en place des neurones glutamatergiques	5
 1.1. Neurogenèse des neurones excitateurs dans la zone ventriculaire corticale 1.2. Mise en place des différentes couches corticales 	5 6
1.3 Mode de migration	9
1.3.1. La translocation	9
1.3.2. La locomotion	10
1.4. Modulation de la migration des neurones glutamatergiques	12
1.4.1. Exemple d'effet autonome cellulaire : dynamique des prolongements de g	uidage.
1.4.2. Exemple de régulation indirecte : l'adhésion des neurones aux cellules de l	13 a glie
radiaire	14
2. Mise en place des neurones GABAergiques	15
2.1. Neurogenèse des neurones inhibiteurs dans le subpallium	15
2.2. Mode de migration des interneurones corticaux	19
2.3. Voies de migration des interneurones	20
2.4. Modulation de la migration des neurones GABAergiques	22
2.4.1. Exemple d'effet autonome cellulaire : la nucléokinèse	23
2.4.2. Exemple de régulation indirecte : les molécules de guidage	24
II/ Malformations corticales liées à des défauts de migration neuronale	25
A. Les dysplasies corticales focales	26
B. Les polymicrogyries	27
C. Les schizencéphalies	28
D. Les hétérotopies	29
E. Les lissencéphalies	31

III/ Le gène ARX : description générale	35
A. Historique	35
1. Première caractérisation chez les vertébrés	35
2. Identification du gène chez l'homme	35
B. Caractéristiques du gène et de la protéine	36
C. Expression d'Arx et fonction dans les différents organes	38
1. ARX et muscle squelettique	39
2. ARX et appareil génital	41
3. ARX et pancréas	43
4. ARX et système nerveux	47
IV/ ARX et défauts neurologiques développementaux	52
A. Les mutations d'ARX : une hétérogénéité phénotypique chez l'Homme	52
1. Pathologies liées à ARX, sans malformation cérébrale apparente	53
1.1 Retards mentaux non syndromiques	53
1.2 Retards mentaux syndromiques	53
2. Pathologies liées à ARX avec malformation cérébrale	55
B. Rôles d'ARX dans le cerveau en développement chez les vertébrés	60
1. ARX : un facteur de transcription bidirectionnel	60

	1. ARX : un facteur de transcription bidirectionnel	60
	2. ARX et régionalisation du cerveau	61
	3. Rôle sur les cellules pyramidales	62
	4. Rôle sur les interneurones	64
	4.1 Prolifération	- 64
	4.2. Migration	- 65
	4.3. Morphologie et différenciation	- 69
	5. Rôle sur la balance excitation/inhibition	71
	6. Schéma récapitulatif	72
C.	Les mutations d'ARX : (GCG)7, P353L, P353R et dup24	- 73
	1 La mutation (CCC)7	70

	,,,
1. La mutation (GCG)7	73
1.1 Phénotype chez l'homme	74
1.2. Les études in vitro et in vivo	74
2. La mutation P353L	75
3. La mutation P353R	75
4. La mutation Dup24	76

RESULTATS

evelopment"	7 7
B. Résultats	8
1. Migration of interneurons is unaffected by ARX (GCG)7 mutation	8
2. Morphology of interneurons is unaffected by ARX (GCG)7 mutation	8
3. Migration of pyramidal neurons and cortical layering is unaffected by ARX (GCG)7
mutation	8
4. Glutamatergic drive is increased in the CA1 field of Arx ^{(GCG)7} mice	8
5. Axonal fibers in CA1 pyramidal cells are abnormal in Arx ^{(GCG)7} mice	8
C. Discussion	9
D. Figures supplémentaires	9
E. Méthodes	10
F. Bibliographie	10

II/ Conséquences de différentes mutations d'ARX sur la morphologie des interneurones 108	
A. Les mutations du gène Arx Dup24 et P353R, adaptées chez la souris, engendrent un défaut de l'arborisation dendritique des interneurones <i>in vitro</i>	
B. Les mutations humaines du gène ARX n'engendrent pas de localisation subcellulaire anormale de la protéine 111	
C. Conséquences des mutations ARX humaines sur l'arborisation dendritique des interneurones <i>in vitro</i> 113	
D. Conclusion 114	
E. Méthodes 116	

DISCUSSION	117
I/ ARX et interneuronopathie	117
II/ ARX et neurones glutamatergiques	121
III/ ARX et hétérogénéité phénotypique	122
IV/ ARX, épilepsie et remaniement de réseau	125
CONCLUSION	129

REFERENCES BIBLIOGRAPHIOUES-	13	0
	15	

ANNEXES	15	5	
		_	

I/ Revue: "Cell-autonomous and cell-to-cell signalling events in normal and altered	I
neuronal migration"	· 155

II/ Article: "A glial origin for periventricular nodular heterotopia caused by impaired	
expression of Filamin-A"	170

Table des illustrations :

Figure 1 : Organisation anatomique du cerveau antérieur en développement	2
Figure 2 : Les régions prolifératives du télencéphale	3
Figure 3 : Les différentes voies de migration des neurones corticaux	4
Figure 4 : Les différents modes de neurogenèse des neurones glutamatergiques pendant le développement cortical.	6
Figure 5 : Les étapes de formation des différentes couches corticales	7
Figure 6 : Marqueurs des couches corticales du néocortex chez l'homme à 29 semaines de gestation	8
Figure 7 : La translocation des neurones glutamatergiques	9
Figure 8 : Les différentes phases de migration par locomotion des neurones excitateurs corticaux	11
Figure 9 : Molécules contrôlant la migration des cellules pyramidales dans le cortex cérébral	12
Figure 10 : Profils transcriptionnels des trois zones progénitrices générant les interneurones corticaux	16
Figure 11 : Mode de neurogenèse des interneurones corticaux au cours du développement	18
Figure 12 : Mode de migration des interneurones corticaux.	19
Figure 13 : Migration tangentielle des interneurones corticaux	21
Figure 14 : Molécules contrôlant la migration des cellules GABAergiques dans le cortex cérébral	22
Figure 15 : Caractéristiques histologiques des sous types de dysplasies focales corticales	26
Figure 16 : IRM d'un patient atteint de polymicrogyrie périsylvienne bilatérale	27
Figure 17 : IRM d'un patient atteint de schizencéphalie	28
Figure 18 : Patients atteints d'hétérotopie nodulaire périventriculaire	29
Figure 19 : IRM de patients atteints de lissencéphalies	32
Figure 20 : Inactivation des gènes LIS1 et DCX par électroporation in utero	33
Figure 21 : Structure du gène et de la protéine ARX	36
Table 1 : Homologie de séquence du gène ARX et de ses orthologues.	37
Figure 22 : Expression du transcrit du gène ARX chez la souris et l'homme	38

Figure 23 : Expression d'Arx dans les muscles chez la souris à différents stades de développement	40
Figure 24 : Hiérarchie des gènes impliqués dans la différenciation embryonnaires des muscles squelettiques	41
Figure 25 : Comparaison de l'appareil génital de souris sauvages et déficientes pour le gène Arx	42
Figure 26 : Représentation schématique des facteurs de transcription impliqués dans la spécification du pancréas endocrine	44
Figure 27 : Représentation schématique réévaluée et non exhaustive de la hiérarchie des facteurs de transcription impliqués dans la spécification des cellules endocrines	46
Figure 28 : Expression de la protéine Arx dans le cerveau embryonnaire de rat et souris	48
Figure 29 : Expression de la protéine Arx dans le cerveau adulte de souris	49
Figure 30 : Expression d'Arx dans les interneurones corticaux et hippocampiques	50
Figure 31 : Hybridation in situ pour le gène ARX sur une coupe coronale de cerveau fœtal humain à 22 semaines de gestation.	51
Figure 32 : IRM d'un patient atteint d'hydranencéphalie avec anormalité génitale	55
Figure 33 : IRM d'un patient atteint du syndrome XLAG	56
Figure 34 : Les mutations d'ARX et leurs phénotypes associés	57
Table 2 : Les différentes mutations d'ARX et leurs phénotypes associés chez l'homme.	59
Figure 35 : Histologie du cerveau post mortem d'un patient atteint du syndrome XLAG	62
Figure 36 : Perte de la voie de migration des interneurones vers la zone intermédiaire chez les souris déficientes pour le gène Arx	66
Figure 37 : Défaut de migration des interneurones chez les souris déficientes pour le gène Arx	67
Table 3 : Variation des différents sous types d'interneurones en fonction des modèles d'altération du gène Arx.	70
Figure 38 : Schéma récapitulatif des principaux rôles d'Arx suggérés dans le développement cérébral	72

Avant propos

Au cours de l'embryogenèse des organismes pluricellulaires, la migration des cellules joue un rôle essentiel dans la formation des tissus et des structures complexes. L'extraordinaire degré d'organisation du cerveau est à l'image de la complexité des mouvements migratoires nécessaires à sa formation. Ainsi, l'étude de la migration neuronale est essentielle pour comprendre les mécanismes impliqués au cours de son développement normal et pathologique.

Les retards mentaux et les épilepsies peuvent résulter d'une variété de causes génétiques ou environnementales et sont souvent étroitement associés. Le développement de nouvelles techniques d'imagerie cérébrale a permis d'identifier les défauts de migration neuronale comme étant la cause majeure de ce type de désordres neurologiques. Ces dernières années, de nombreuses mutations dans le gène ARX (<u>A</u>ristaless <u>r</u>elated homeobo<u>x</u> gene), ont été identifiées dans une grande variété de désordres neurologiques précoces incluant ou non des malformations cérébrales pendant le développement embryonnaire, le plus souvent associés à des épilepsies. Il est proposé que le gène ARX joue un rôle primordial au cours du développement cérébral, notamment sur la migration des neurones GABAergiques. Son implication au cours de la mise en place du système nerveux central reste cependant encore mal connue.

L'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier le rôle du gène ARX et les conséquences de ses mutations sur le développement cérébral dans le but de mieux comprendre et éventuellement de prévenir de telles pathologies.

Au cours de ce manuscrit, une introduction générale en deux parties replacera la migration neuronale et le gène ARX dans un contexte bibliographique. Les résultats des travaux réalisés au cours de ma thèse seront ensuite présentés. Le premier chapitre sera consacré à l'effet d'une mutation particulière du gène ARX (retrouvée dans des désordres neurologiques sans malformation du cerveau, tels que le syndrome de West), sur le développement des cellules excitatrices et inhibitrices du cortex cérébral. Le second chapitre présentera des résultats préliminaires concernant l'effet de plusieurs mutations différentes du gène sur la morphologie des interneurones. Enfin, la dernière partie de ce manuscrit sera consacrée à une discussion générale des résultats de ces travaux.

INTRODUCTION

I/ Développement du cortex cérébral.

A. Généralités

Le cerveau antérieur est un assemblage complexe de plusieurs structures dérivant de la partie antérieure du tube neural : le proencéphale, lui-même constitué de deux vésicules : le diencéphale et le télencéphale (Rallu et al., 2002). Le télencéphale est composé de deux régions : le pallium (partie dorsale) et le subpallium (partie ventrale). Le pallium donnera naissance au cortex cérébral et à l'hippocampe alors que le subpallium aboutira aux éminences ganglionnaires latérales et médianes (**Figure 1**) (Marín and Rubenstein, 2003).



Figure 1 : Organisation anatomique du cerveau antérieur en développement.

A. Schéma d'une coupe sagittale de cerveau de souris à E12.5 montrant les deux parties du cerveau antérieur : le diencéphale et le télencéphale. Dans le télencéphale, le pallium apparait en gris clair alors que le subpallium apparait en gris foncé. **B**. Schéma d'une coupe coronale de cerveau de souris à E12.5 du télencéphale montrant les différentes régions. LGE : éminence ganglionnaire latérale, MGE : éminence ganglionnaire médiane, POA : aire préoptique antérieure. (Tiré de (Marín and Rubenstein, 2003)).

B. Génération et mise en place des neurones du cortex cérébral.

Les mécanismes du développement cortical (ou corticogenèse) sont relativement similaires chez tous les mammifères et peuvent être divisés en trois étapes majeures :

i) <u>la prolifération neuronale</u>, étape pendant laquelle les cellules souches neurales prolifèrent et se différencient. Elle nécessite l'induction de facteurs de transcription tels que les gènes à homéobox (Wigle and Eisenstat, 2008). Ces facteurs établissent, par le biais d'interactions répressives mutuelles, des frontières entre différentes zones progénitrices où sont générées les différentes cellules neuronales (Wigle and Eisenstat, 2008; Wilson and Rubenstein, 2000). Ainsi, les deux types cellulaires principaux du cortex cérébral adulte sont générés dans des zones progénitrices bien distinctes : les neurones excitateurs (glutamatergiques) sont issus de la zone ventriculaire du pallium dorsal tandis que les neurones inhibiteurs (GABAergiques) sont générés dans la zone ventriculaire du subpallium ventral (**Figure 2**) (Wilson and Rubenstein, 2000).



Figure 2 : Les régions prolifératives du télencéphale.

Schéma d'une coupe coronale de cerveau de souris à E14. En rouge, la zone ventriculaire corticale générant les neurones glutamatergiques; en bleu la zone ventriculaire du subpallium ventral générant les neurones GABAergiques; en vert, la zone progénitrice générant les neurones à acétylcholine. Cx : Cortex, LV : ventricule latéral, LGE : éminence ganglionnaire latérale, MGE : éminence ganglionnaire médiane, POA : aire préoptique antérieure. (D'après (Wilson and Rubenstein, 2000)).

ii) <u>la migration neuronale</u> où les cellules migrent pour atteindre leur destination finale. Chaque type cellulaire possède un mode de migration bien distinct : les neurones glutamatergiques (ou pyramidaux) migrent de façon radiaire vers leurs couches corticales de destination tandis que les neurones GABAergiques (ou interneurones) migrent de façon tangentielle pour atteindre leur position finale (**Figure 3**). Les deux populations neuronales migrent et se positionnent de manière ordonnée dans les différentes couches du néocortex en développement.



Figure 3 : Les différentes voies de migration des neurones corticaux.

a. Les neurones excitateurs migrent radialement à partir de la zone ventriculaire dorsale (flèches vertes). **b-c**. Les neurones GABAergiques sont originaires des structures du subpallium et migrent tangentiellement (flèches violettes) vers le bulbe olfactif (**b**) ou le cortex (**c**). **d**. Une partie des interneurones qui arrivent au niveau du cortex se dirigent vers la zone ventriculaire, avant de migrer radialement dans les différentes couches du cortex en formation. LGE : éminence ganglionnaire latérale, MGE : éminence ganglionnaire médiane. (Tiré de (Ayala et al., 2007)).

iii) <u>l'organisation finale des neurones en six couches</u>. Elle est entre autre associée à la synaptogénèse, un processus au cours duquel les neurones établissent des contacts avec d'autres neurones et vont pouvoir échanger de nombreux signaux. La synaptogénèse est un processus qui débute au cours du développement embryonnaire et se poursuit après la naissance.

Nous nous intéresserons ici aux deux premières étapes de la corticogenèse, pour les deux principales populations de neurones : les neurones glutamatergiques et GABAergiques.

1. Mise en place des neurones glutamatergiques.

1.1. Neurogenèse des neurones excitateurs dans la zone ventriculaire corticale.

Avant la période de neurogenèse (jusqu'à E9-E10 chez la souris), la zone ventriculaire corticale est composée de cellules neuroépithéliales précoces, considérées comme les véritables cellules souches du système nerveux central, qui se divisent de façon symétrique dans un premier temps pour donner plus de cellules neuroépithéliales, puis dans un deuxième temps deviennent des cellules de la glie radiaire. Ces cellules ont une morphologie bipolaire caractéristique, avec un prolongement au contact de la bordure du ventricule et l'autre prolongement au contact de la surface externe du cortex cérébral (pour revue voir (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009)). En 2001, l'équipe du *Dr Kriegstein*, a suggéré pour la première fois que les cellules de la glie radiaire sont les progéniteurs des neurones corticaux (Noctor et al., 2001).

Ainsi, les cellules de la glie radiaire, tout en maintenant leur polarité apico-basale se divisent de façon asymétrique :

i) <u>dans la zone ventriculaire</u> pour donner naissance à deux cellules filles distinctes : un jeune neurone et une cellule de la glie radiaire, assurant à la fois l'auto-renouvellement des progéniteurs et la génération de nouveaux neurones (**Figure 4**) (Haubensak et al., 2004; Noctor et al., 2004).

ii) <u>dans la zone sous-ventriculaire</u> pour générer des progéniteurs intermédiaires qui, après un ou plusieurs cycles d'amplification, donnent naissance à des jeunes neurones (Figure 4) (Haubensak et al., 2004; Noctor et al., 2004). Ces étapes d'amplification additionnelles sont fondamentales pour augmenter la taille du cortex pendant le développement (Noctor et al., 2007).

A la fin du développement embryonnaire, la plupart des cellules de la glie radiaire se détachent de la surface apicale pour devenir des astrocytes (Noctor et al., 2008). Cependant une sous population de cellules radiaires restent en contact avec la surface apicale et continuent de fonctionner comme précurseurs neuronaux à des stades post nataux et adultes (Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Ming and Song, 2005).



Figure 4 : Les différents modes de neurogenèse des neurones glutamatergiques pendant le développement cortical.

Les cellules de la glie radiaire génèrent des nouveaux neurones de façon directe par division asymétrique dans la zone ventriculaire ou de façon indirecte par la génération de progéniteurs intermédiaires dans la zone sous-ventriculaire. CP : plaque corticale, IZ : zone intermédiaire, MZ : zone marginale, nIPC : progéniteurs intermédiaires, SVZ : zone sous ventriculaire, VZ : zone ventriculaire, NE : neuroépithélium. Flèches noires : transformation directe, flèches rouges : division symétrique, flèches bleues : division asymétrique. (Tiré de (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009).

1.2. Mise en place des différentes couches corticales

La période de migration neuronale corticale s'étend de E11 à E18 chez la souris (pour revues voir (Gupta et al., 2002; Marín and Rubenstein, 2003)). Les neurones générés dans la zone ventriculaire du cortex suivent une série d'étapes hautement coordonnées (Bayer et al., 1991). Il est maintenant clairement établi que la glie radiaire constitue un support migratoire pour les neurones générés dans la zone ventriculaire corticale. Ces neurones, une fois générés, migrent le long de cette glie radiaire (d'où le terme de migration radiale) pour atteindre les différentes

couches corticales ((Noctor et al., 2001; Rakic, 1978), pour revue voir (Rakic, 2007)). A E11, la première vague de neurones postmitotiques qui migrent en dehors de la zone ventriculaire corticale, de façon radiale (ou perpendiculaire) au cortex, constituent la préplaque (**Figure 5**). La seconde vague, à E13, divise la préplaque en une zone marginale et une zone plus profonde : la sous plaque. De cette façon, une couche entre ces deux zones est crée : la plaque corticale (**Figure 5**). Entre E14 et E18, des vagues successives de neurones postmitotiques continuent leur sortie de la zone ventriculaire et migrent radialement pour traverser la sous plaque et former les différentes couches de la plaque corticale (**Figure 5**). La mise en place des différentes couches corticales se fait d'une façon « *inside-to-outside »*, où les neurones les plus anciens constituent les couches profondes et les jeunes neurones occupent les couches les plus superficielles (Angevine and Sidman, 1961). Une fois que la plaque corticale est entièrement établie, la sous plaque disparait et laisse place à un cortex constitué de six couches qui persiste à l'âge adulte (**Figure 5**).



Figure 5 : Les étapes de formation des différentes couches corticales.

Stades développementaux clés (E) des différentes vagues successives de migration radiaire. PP : préplaque, VZ : zone ventriculaire, IZ : zone intermédiaire, SP : sous plaque, CP : plaque corticale, MZ : zone marginale, PS : surface de la pie. (Tiré de (Gupta et al., 2002)).

De nombreux gènes spécifiques sont impliqués dans chaque étape de la lamination corticale. Ainsi, l'expression de certains de ces gènes peut être utilisée pour visualiser spécifiquement les différentes couches du cortex (**Figure 6**) (Saito et al., 2011).



Figure 6 : Marqueurs des couches corticales du néocortex chez l'homme à 29 semaines de gestation.

A. Les six couches corticales sont visualisées par une coloration hématoxyline-éosine. **B**. *STAB2* (Special AT-rich binding protein 2) est exprimée spécifiquement dans les couches II-V (notamment dans la couche II et la partie supérieure de la couche IV). **C**. *CUTL1* (Cut-like homeobox gene ou *CDP*) est exprimée de façon diffuse entre les couches II-V de façon prédominante dans la couche II. **D**. *FOXP1* (Forkhead box P1) est retrouvée au niveau des couches V-VI. **E**. *OTX1* (Orthodenticle homeobox 1) est exprimée dans les couches supérieures et les couches V-VI. **F**. *CTIP2* (C2H2-type zinc finger protein ou *Bc11b*) est localisée dans la couche V. **G**. *TBR1* (T-box homeobox gene) est localisée dans les couches V-VI. Barre d'échelle : 100µm. (Tiré de (Saito et al., 2011)).

1.3 Mode de migration

Grâce à des expériences de time-lapse sur des tranches aigues de cortex, l'équipe de *Nadarajah et al.* en 2001, a montré que la migration des neurones corticaux est caractérisée par deux types de mouvements bien distincts : la translocation et la locomotion (Nadarajah et al., 2001), (pour revue voir (Gupta et al., 2002; Nadarajah and Parnavelas, 2002)).

1.3.1. La translocation.

Ce type de migration radiaire est retrouvé au tout début de la mise en place du cortex. En effet, les jeunes neurones qui vont former la préplaque utilisent ce mode de migration. Le fait que l'épaisseur du cortex à ce stade de développement soit encore fine permet aux jeunes neurones de garder leurs *leading processes* (ou prolongements de guidage) attachés à la surface extérieure du cortex. Ainsi, le raccourcissement continu et régulier de leurs prolongements de guidage, leur permet de sortir de la zone ventriculaire et de « transloquer » rapidement leur soma vers la surface extérieure du cortex (ou pie), et ceci indépendamment de la glie radiaire (**Figure 7**) (Nadarajah et al., 2001).



Figure 7 : La translocation des neurones glutamatergiques.

A. Aux stades précoces de la migration, les jeunes neurones générés (en rose) migrent de façon indépendante de la glie radiaire (représentée par les traits verticaux). Leurs prolongements de guidage, attachés à la surface de la pie, vont se raccourcir progressivement et les corps cellulaires vont se « transloquer » vers la surface de la pie (Tiré de (Gupta et al., 2002). **B**. Images enregistrées en temps réel montrant la translocation d'une cellule sur une tranche corticale de cerveau de souris préalablement marquée avec de l'Oregon vert BAPTA-1 488 AM. Barre d'échelle: 10μm. (Tiré de (Nadarajah and Parnavelas, 2002)).

1.3.2. La locomotion

Etant donné que l'épaisseur du cortex s'épaissit rapidement au cours de la mise en place des premiers neurones, les neurones générés plus tardivement dans la zone ventriculaire corticale ne peuvent pas attacher leurs prolongements de guidage à la surface de la pie. Ainsi, pour atteindre leur couche finale de destination, ces cellules passent par une série d'étapes migratoires distinctes caractérisées par des changements rapides de leur morphologie, de leur direction de mouvement et de leur vitesse de migration (Noctor et al., 2004; Tabata and Nakajima, 2003). Ce mode de migration appelée « locomotion » est caractérisé par quatre phases distinctes (**Figure 8**) :

i) Les neurones générés dans la zone ventriculaire vont migrer le long de la glie radiaire qui leur a donné naissance vers la zone sous ventriculaire (Noctor et al., 2004).

ii) Ils vont ensuite s'arrêter dans les zones sous ventriculaire et intermédiaire corticales. Au cours de cette pause d'environ 24h, les neurones adoptent une morphologie multipolaire et sont très dynamiques (ils étendent et rétractent leurs prolongements et bougent dans la zone sous ventriculaire). Ils ne sont plus attachés à la glie radiaire et peuvent même migrer tangentiellement (Tabata and Nakajima, 2003).

iii) Certains neurones passent par une troisième phase (appelée phase rétrograde) au cours de laquelle ils émettent un prolongement en direction du ventricule et peuvent « transloquer » leur corps cellulaire vers la zone ventriculaire (Noctor et al., 2004).

iv) Les neurones changent ensuite de polarité, étendent leur prolongement de guidage vers la surface de la pie. Ils adoptent une morphologie bipolaire caractéristique des neurones en migration : un prolongement de guidage ou *leading process* orienté vers la surface externe du cortex, un autre prolongement ou *trailing process* orienté vers le ventricule. Cette morphologie leur permet alors de migrer le long de la glie radiaire vers la plaque corticale par des mouvements discontinus du corps cellulaire (et donc des noyaux) tout en maintenant une longueur constante du prolongement de guidage (Nadarajah et al., 2001; Noctor et al., 2004).



Figure 8 : Les différentes phases de migration par locomotion des neurones excitateurs corticaux.

A. Schéma explicatif des différentes phases. Phase 1. La première phase est caractérisée par un mouvement radial des nouveaux neurones générés (en vert foncé) de la zone ventriculaire, vers la zone sous ventriculaire. Phase 2. Les neurones deviennent multipolaires et stoppent leur migration dans les zones sous ventriculaire et intermédiaire. Phase 3 : migration rétrograde des neurones vers la zone ventriculaire. Phase 4 : migration radiale finale des neurones le long de la glie radiaire (en vert clair) jusqu'à la plaque corticale (Tiré de (Kriegstein and Noctor, 2004).

B. Enregistrement en temps réel d'une cellule passant par les quatre phases de la locomotion. Phase 1 (en 1). Phase 2 : t=0h. Phase 3 : t=4-18h. Phase 4 : t=24-96h. VZ : zone ventriculaire, SVZ : zone sous ventriculaire, IZ : zone intermédiaire, CP : plaque corticale, ZM : zone marginale. (Tiré de (Noctor et al., 2004)).

1.4. Modulation de la migration des neurones glutamatergiques

La migration des cellules pyramidales est régulée par différents facteurs et ceci de façon cellule autonome (facteur intrinsèque à la cellule) ou par des événements de signalisation de cellules à cellules (facteurs indirectes) (**Figure 9**). Ainsi, la dynamique des prolongements de guidage et les mouvements nucléaires sont régulés par des facteurs intrinsèques (modulation cellule autonome) alors que l'adhérence cellulaire et le guidage des cellules se fait par le biais de mécanismes de signalisation cellule à cellule (pour plus de détails, voir notre revue Manent et al., 2011 en Annexe 1). Deux exemples de ces régulations vont maintenant être décrits : la régulation intrinsèque de la dynamique des prolongements de guidage et la régulation indirecte de l'adhésion des neurones aux cellules de la glie radiaire.



Figure 9 : Molécules contrôlant la migration des cellules pyramidales dans le cortex cérébral.

Les acteurs moléculaires impliqués dans la migration des cellules pyramidales le long de la glie radiaire sont listés en fonction de leur rôle. Les mécanismes cellules autonomes sont en bleus, les mécanismes de cellules à cellules sont en verts. (Tiré de Manent et al., 2011, sous presse (voir annexe 1)).

1.4.1. Exemple d'effet autonome cellulaire : dynamique des prolongements de guidage.

Comme évoqué, la dynamique des prolongements de guidage est un processus crucial pour la migration des neurones glutamatergiques leur permettant de se déplacer le long de la glie radiaire. Des altérations de leur dynamique sont associées à des défauts de migration neuronale. Bien que les mécanismes impliqués dans cette dynamique soient peu connus, certaines molécules, présentes dans les neurones en migration, ont été identifiées.

La protéine *Cdk5* (cyclin-dependent kinase) semble par exemple être cruciale dans cette régulation. En effet, l'équipe de *Kawauchi et al.*, en 2006, a montré que l'expression d'une forme dominante négative de Cdk5 après électroporation *in utero* entraine un défaut de migration des neurones pyramidaux (Kawauchi et al., 2006). Une altération de la morphologie des prolongements de guidage des cellules de la zone intermédiaire corticale est observée : les neurones conservent une forme arrondie et étendent des prolongements de guidage beaucoup plus fins comparés à une condition contrôle (Kawauchi et al., 2006).

De la même façon, l'inactivation, dans les progéniteurs des neurones pyramidaux, d'autres gènes entrainent une altération de la morphologie des prolongements de guidage :

- l'absence du gène Rnd2 (codant pour une protéine appartenant à la famille des protéines G) entraine des défauts de migration associés à une augmentation du nombre de cellules multipolaires dans la zone intermédiaire corticale ainsi qu'à une augmentation atypique du nombre de branchements des prolongements de guidage des neurones de la zone intermédiaire supérieure et de la plaque corticale (Heng et al., 2008).

- l'absence du gène p600 (codant pour une protéine associée aux microtubules) aboutit à des altérations morphologiques des neurones de la zone intermédiaire corticale qui présentent des prolongements de guidage beaucoup plus fins et ondulés (Shim et al., 2008).

- l'inactivation du gène DCX (codant pour la *doublecortine*, une protéine associée aux microtubules) entraine une accumulation de cellules au stade multipolaire dans la zone intermédiaire corticale (Bai et al., 2003).

- la perte du gène Lis1 (codant pour une protéine associée aux microtubules) entraine également une augmentation du nombre de cellules multipolaires et une augmentation du nombre de branchements dans les zones ventriculaire et sous ventriculaire corticales (Tsai et al., 2005).

L'ensemble de ces protéines exprimées dans les neurones pyramidaux en migration régulent donc de façon intrinsèque (ou cellule autonome) la dynamique des prolongements de guidage.

1.4.2. Exemple de régulation indirecte : l'adhésion des neurones aux cellules de la glie radiaire.

L'adhésion des neurones glutamatergiques à la glie radiaire est essentielle pour leur migration vers la plaque corticale. De nombreuses protéines appartenant à la famille des molécules d'adhésion ou des protéines membranaires liées au cytosquelette ont été identifiées dans ces interactions « cellule à cellule » et permettent de garder l'intégrité structurale de la glie radiaire.

Les protéines *Neuregulines*, *Astrotactines* et leurs récepteurs, ont été les premières molécules décrites pour jouer un rôle dans les interactions neurone-glie (Adams et al., 2002; Anton et al., 1997; Rio et al., 1997).

Il a été montré que les *Intégrines* sont aussi nécessaires à cette adhésion, puisque des altérations de ces protéines aboutissent à une désorganisation de l'intégrité de la glie radiaire au niveau basal (Anton et al., 1999; De Arcangelis et al., 1999; Georges-Labouesse et al., 1998; Graus-Porta et al., 2001).

Les sous unités des jonctions gap (*connexin 26* et *43*) sont enrichies au niveau des points de contact entre les neurones et les cellules de la glie radiaire (Elias et al., 2007). L'inactivation du gène codant ces connexines *in utero* entraine des défauts de migration ce qui suggère que l'adhésion de ces deux types cellulaires, via les jonctions gap est nécessaire pour la migration (Elias et al., 2007).

Enfin, notre équipe a récemment montré que le gène FlnA (codant pour une protéine liée à l'actine) est impliqué de façon indirecte dans la régulation de la migration. En effet, l'inactivation *in utero* de ce gène dans les progéniteurs de la zone ventriculaire corticale entraine une altération de la zone germinative corticale, y compris la glie radiaire, aboutissant à un défaut de migration (Carabalona et al., 2011, voir Annexe 2)

L'ensemble de ces données montrent que la migration des neurones glutamatergiques est régulée aussi de façon indirecte, par l'intermédiaire de molécules agissant sur l'intégrité de la glie radiaire qui est essentielle pour les mouvements de ces neurones vers la plaque corticale.

2. Mise en place des neurones GABAergiques.

2.1. Neurogenèse des neurones inhibiteurs dans le subpallium.

Quatre zones du subpallium sont responsables de la génération des neurones GABAergiques du cerveau en développement : l'éminence ganglionnaire médiane, latérale et caudale et l'aire préoptique (pour revues voir (Batista-Brito and Fishell, 2009; Gelman and Marín, 2010)). i) <u>L'éminence ganglionnaire médiane (EGM)</u> :

Cette zone est responsable de la genèse d'environ 50 à 60% des interneurones corticaux chez la souris. Des expériences de transplantation ont montré que l'EGM peut être divisée en deux parties : la zone ventrale donnant naissance aux interneurones exprimant la parvalbumine et la partie dorsale générant les interneurones exprimant la somatostatine (Wonders et al., 2008).

ii) L'éminence ganglionnaire latérale (EGL) :

Des analyses d'expression de gènes couplées à des études de perte de fonction ont montré que l'EGL peut être divisée en deux domaines, un dorsal et un ventral. La région dorsale (qui sépare le pallium du subpallium) donne naissance aux futurs interneurones du bulbe olfactif tandis que la région ventrale donne naissance aux interneurones du striatum (Stenman et al., 2003). Il semblerait que cette zone soit aussi responsable de la génération des interneurones corticaux et hippocampiques plus tardive (Anderson et al., 2001).

iii) L'éminence ganglionnaire caudale (EGC) :

Cette zone contribue à l'élaboration d'environ 30 à 40% des interneurones corticaux. Il a été démontré que les interneurones dérivés des progéniteurs de l'EGC expriment le peptide vasointestinal (VIP), la calrétinine et la Reelin (Butt et al., 2005; Xu et al., 2004).

iv) L'aire préoptique (APO) :

Une étude récente a montré qu'environ 5% des interneurones corticaux sont originaires de l'aire préoptique (Gelman et al., 2009). Les interneurones dérivant de l'APO expriment la parvalbumine, la somatostatine, la calrétinine et le peptide vaso-intestinal (VIP) (Gelman et al., 2009).

Des analyses de profils d'expression de différents gènes ont permis de définir les trois principales sources des neurones GABAergiques du cortex cérébral : l'EGC, l'EGM et l'APO (**Figure 10**). Ainsi, chaque région progénitrice donne naissance à un groupe particulier d'interneurones, même si certains types d'interneurones peuvent être générés par plusieurs de ces régions.



Figure 10 : Profils transcriptionnels des trois zones progénitrices générant les interneurones corticaux.

A gauche, les trois principales sources d'interneurones corticaux : l'éminence ganglionnaire caudale (CGE, en rouge), l'éminence ganglionnaire médiane dorsale et ventrale (dMGE, vMGE, en jaune) et l'aire préoptique (POA, en vert). Chaque région contient les progéniteurs qui se différencient par l'expression de différents facteurs de transcription et d'autres protéines. Ainsi, les cellules de la CGE expriment *Dlx1/2* et *Couptf2*, les cellules de la MGE expriment *Dlx1/2* et *Nkx2.1*, et les cellules de la POA expriment *Dlx1/2*, *Shh* et *Nkx2.1*. De manière générale, chaque région produit un groupe particulier d'interneurones (à droite). Les interneurones exprimant Reelin et le NPY sont un cas particulier puisqu'ils dérivent à la fois de la CGE et de la POA. VIP : peptide vaso-intestinal, CR : calrétinine, NPY : neuropeptide Y, SST : somatostatine, PV : parvalbumine, Dlx : distal-less homeobox, Nkx2.1 : NK2-related homeobox transcription factor 1, Shh : sonic hedgehog, Sox : Sry-related HMG box , Lhx6 : LIM/homeodomain gene. (Tiré de (Gelman and Marín, 2010)).

Peu de travaux ont été réalisés sur le processus cellulaire aboutissant à la génération des interneurones dans ces trois zones progénitrices. Très récemment, une étude à été réalisée afin de clarifier ces mécanismes (Brown et al., 2011). Cette équipe a adapté une méthode pour marquer spécifiquement et individuellement les progéniteurs des éminences ganglionnaires médianes et de l'aire préoptique à l'aide de rétrovirus injectés *in utero* chez la souris. Par cette technique, ils ont montré que les progéniteurs des interneurones dans la zone ventriculaire de l'éminence ganglionnaire médiane et de l'aire préoptique ont pour origine des cellules de la glie radiaire (Brown et al., 2011). Ces cellules se divisent de façon asymétrique à la surface de la zone ventriculaire pour s'auto-renouveler et simultanément produire un interneurone différencié ou un progéniteur intermédiaire. Les progéniteurs intermédiaires se divisent ensuite de façon symétrique dans la zone sous ventriculaire pour donner naissance à des interneurones différenciés (Brown et al., 2011). Une fois différencié, les interneurones vont migrer à l'extérieur de la zone sous ventriculaire pour coloniser tangentiellement le cortex (Figure 11). Ce phénomène est donc très similaire à la génération des neurones glutamatergiques, mis à part l'expression transcriptionnelle de certains facteurs présents dans les cellules progénitrices qui spécifie les interneurones inhibiteurs versus les neurones glutamatergiques.





Figure 11 : Mode de neurogenèse des interneurones corticaux au cours du développement.

A. Schéma récapitulatif. Les cellules progénitrices de la glie radiaire se divisent de façon asymétrique à la surface de la zone ventriculaire pour s'auto-renouveler et générer des interneurones différenciés ou des progéniteurs intermédiaires qui vont se diviser de façon symétrique dans la zone sous ventriculaire pour produire des interneurones différenciés. A.D : division asymétrique, S.D : division symétrique. B. Images en temps réel d'une cellule progénitrice de la glie radiaire qui se divisent de façon asymétrique à la surface de la zone ventriculaire de l'éminence ganglionnaire médiane. Les flèches indiquent la cellule de la glie radiaire originale et auto-renouvelée. Les têtes de flèches montrent la cellule fille différenciée qui migre le long de la glie radiaire pour sortir de la zone ventriculaire et qui va ensuite migrer de façon tangentielle vers le néocortex. Les pointillés indiquent l'orientation du plan de clivage de la division. Barres d'échelle : 50µm. C. Images en temps réel de la division symétrique des progéniteurs intermédiaires dans la zone sous ventriculaire de l'éminence ganglionnaire médiane. Les flèches indiquent la cellule de la glie radiaire; les têtes de flèches pleines, les progéniteurs intermédiaires et leurs cellules filles; les têtes de flèches vides, la nouvelle cellule fille générée à partir de la cellule de la glie radiaire initiale. Les pointillés indiquent l'orientation des plans de clivage des différentes divisions. Barres d'échelle : 50µm. (Tiré et adapté de (Brown et al., 2011)).

2.2. Mode de migration des interneurones corticaux.

Une fois généré, les interneurones adoptent un mode de migration tangentiel pour coloniser le néocortex. Pendant leur migration, les interneurones possèdent des prolongements de guidage avec plusieurs branches et sont capables d'interagir avec plusieurs substrats, qui restent cependant mal connus (Marín and Rubenstein, 2001; Nadarajah and Parnavelas, 2002).

Les interneurones corticaux colonisent les couches corticales par des cycles migratoires répétés (**Figure 12**). Un cycle migratoire se déroule de la façon suivante :

i) <u>Une phase dite de « repos »</u> pendant laquelle la cellule étend une branche de son prolongement de guidage et une dilatation périnucléaire apparait contenant l'appareil de Golgi et le centrosome de la cellule (Bellion et al., 2005; Métin et al., 2006). Les autres branches du prolongement de guidage continuent de s'étendre et de se rétracter (Martini et al., 2009).

ii) <u>Une phase de mouvement</u> au cours de laquelle le noyau réalise une étape de nucleokinèse et se déplace vers l'avant de la cellule (vers le prolongement de guidage) (Bellion et al., 2005; Métin et al., 2006; Valiente and Marín, 2010).

Une autre branche du prolongement de guidage commence ensuite à s'étendre de nouveau et le cycle est répété. Ainsi, le prolongement de guidage détermine la direction du mouvement et la migration effective est vraiment réalisée par la translocation du noyau (ou nucléokinèse).





A. 1 et 1'. Phase de repos des noyaux (n). 2 et 2'. Phase de translocation des noyaux (T) (Tiré et adapté de (Métin et al., 2006)). **B**. Enregistrement en temps réel d'une cellule de l'éminence ganglionnaire médiane exprimant la GFP sur des cellules corticales dissociées. Les trois translocations du noyau sont illustrées en a-b-c. Entre les phases de translocation, le prolongement de guidage s'allonge (en rouge). Un prolongement de guidage, en train de se diviser en deux branches, est illustré (étoile). Le temps est indiqué en minutes (Tiré de (Bellion et al., 2005).

2.3. Voies de migration des interneurones.

Au cours du développement cérébral, les neurones inhibiteurs migrent selon deux voies de migration principales :

 i) <u>la voie de migration rostrale</u> où les précurseurs des interneurones générés dans l'éminence ganglionnaire latérale migrent pour atteindre le bulbe olfactif (Marín and Rubenstein, 2003).
 Cette voie de migration persiste à des stades adultes (Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Marín and Rubenstein, 2003).

ii) <u>la voie de migration depuis le subpallium ventral vers le néocortex</u>, qui va nous intéresser ici, où les interneurones générés dans les éminences ganglionnaires médiane et caudale et dans l'aire préoptique vont migrer de façon tangentielle pour atteindre leurs couches corticales de destination.

La migration tangentielle des interneurones dans le cortex suit deux voies de migration (**Figure 13**) (Nadarajah and Parnavelas, 2002; Tanaka et al., 2006) :

i) <u>une voie dite « superficielle »</u>, utilisée à des stades précoces, où les neurones migrent à travers la zone marginale ou la sous plaque corticale.

ii) <u>une voie dite « profonde »</u>, utilisée plus tardivement, où les neurones migrent dans la partie basse de la zone intermédiaire et la zone sous ventriculaire corticale.

Plusieurs équipes ont aussi montré que les interneurones doivent passer d'un mode de migration tangentiel à un mode de migration radial afin d'atteindre leur destination finale au sein de la plaque corticale (Ang et al., 2003; Nadarajah and Parnavelas, 2002). Plus récemment, l'équipe de *Tanaka et al.*, en 2009, a montré que les interneurones parcourent de longues distances dans la zone marginale avant de coloniser radiairement la plaque corticale (Tanaka et al., 2009). De façon intéressante, il a été suggéré que la glie radiaire pourrait servir de matrice structurale pour le positionnement des interneurones dans le cortex (Yokota et al., 2007). Ainsi, il semblerait que les interneurones atteignent le cortex de façon confinée à travers une des deux voies de migration (superficielle ou profonde) puis adoptent une migration radiaire pour atteindre leur destination finale dans la plaque corticale.





Figure 13 : Migration tangentielle des interneurones corticaux.

A. Schéma d'une coupe coronale de cerveau de souris à E15 montrant la voie de migration tangentielle superficielle plus précoce (en bleu) et profonde plus tardive (en rouge). Lorsque la plaque corticale émerge, une voie de migration additionnelle est formée dans la sous plaque (en vert) (Tiré de (Hernández-Miranda et al., 2010). **B**. Schéma montrant les mouvements tangentiels et radiaires des interneurones dans le cortex en développement à E13.5 et E14.5 (Tiré de(Hernández-Miranda et al., 2010)). **C-D**. Distribution des interneurones GFP+ d'une souris transgénique homozygote pour la GAD67 (Gutamic acid decarboxylase)-GFP à E13.5 (**C**) et à E15.5 (**D**). NCx : néocortex, St : Striatum, MGE : éminence ganglionnaire médiane, LV : ventricule latéral, CP : Plaque corticale, PP : préplaque, IZ : zone intermédiaire, MZ : zone marginale, SP : sous plaque, SVZ : zone sous ventriculaire, VZ : zone ventriculaire. (Tiré de (Tanaka et al., 2006)).

2.4. Modulation de la migration des neurones GABAergiques.

De la même façon que pour la migration radiaire des cellules glutamatergiques, la migration tangentielle des interneurones est hautement régulée par différents facteurs. Ces facteurs agissent soit de façon cellule autonome (facteur intrinsèque à la cellule) pour la dynamique des prolongements de guidage et les mouvements nucléaires, soit par le biais de mécanismes de signalisation cellule à cellule (facteurs indirectes), pour le guidage des cellules et l'adhésion aux substrats (**Figure 14**) (pour plus de détails, voir notre revue Manent et al., 2011 en Annexe 1). Deux exemples de ces régulations vont maintenant être décrits : la régulation intrinsèque de la nucléokinèse et la régulation indirecte par l'intermédiaire des molécules de guidage.





Les acteurs moléculaires impliqués dans la migration tangentielle des cellules GABAergiques sont listés en fonction de leur rôle. Les mécanismes cellule autonome sont en bleus, les mécanismes de cellule à cellule sont en verts. (Tiré de Manent et al., 2011, sous presse (voir Annexe 1)).

2.4.1. Exemple d'effet autonome cellulaire : la nucléokinèse.

Comme abordé précédemment, les mouvements nucléaires des interneurones au cours de la migration se déroulent en deux étapes : une phase de repos au cours de laquelle le centrosome (centre organisateur des microtubules) et l'appareil de Golgi se déplacent vers le prolongement de guidage et une phase de translocation du noyau. Il a été proposé que les déformations des neurones en migration soient liées au cytosquelette.

La *doublecortine*, qui est une protéine associée aux microtubules semble participer à ce phénomène. En effet, les souris déficientes pour le gène DCX, codant pour la *doublecortine*, présentent des défauts de nucléokinèse des interneurones. Ces cellules présentent une dilatation plus large du compartiment cytoplasmique contenant le centrosome, qui, au lieu de bouger de façon progressive vers l'avant de la cellule, bouge d'avant en arrière dans le prolongement de guidage (Kappeler et al., 2006). Ces données suggèrent ainsi qu'une régulation fine des microtubules est nécessaire au mouvement du noyau des interneurones en migration.

En 2005, *Bellion et al.* ont montré que des filaments d'actine associés à la myosine (actomyosine) s'accumulent dans le compartiment périnucléaire à l'arrière de la cellule, avant la phase de mouvement du noyau et que l'inhibition de la *Myosine II* abolit les mouvements saltatoires des noyaux (Bellion et al., 2005). Ces travaux suggèrent ainsi que le cytosquelette d'actomyosine aurait un rôle dans le contrôle des mouvements nucléaires des neurones GABAergiques.

Plus récemment, *Martini et Valdeolmillos*, en 2010, ont confirmé cette accumulation de *Myosine* à l'arrière de la cellule. Ils ont aussi montré que l'*Actine* est également accumulée à l'arrière de la cellule et que cette accumulation augmente progressivement jusqu'à la fin de la nucléokinèse (Martini and Valdeolmillos, 2010).

L'ensemble des ces données montrent que la régulation du cytosquelette, de façon cellule autonome, est extrêmement importante pour le processus de nucléokinèse des interneurones.

2.4.2. Exemple de régulation indirecte : les molécules de guidage.

De nombreuses molécules secrétées, appelées molécules de guidage, contrôlent la migration des interneurones par des signaux attracteurs ou répulsifs.

Il a été montré, par exemple, que la *Neuregulin 1* agit comme chimioattractant pour la migration des interneurones *in vitro* et que son expression ectopique sur des coupes de cerveau redirige la migration des interneurones vers la source de *Neuregulin* (Flames et al., 2004; Martini et al., 2009).

Les *Sémaphorines* de classe 3, quant à elles, ont une action répulsive pour la migration des interneurones. Des expériences de greffes et de cultures organotypiques ont en effet montré que l'entrée des interneurones dans le striatum en développement exprimant les *Sema3A* et *3F*, est empêchée et que l'expression ectopique de ces molécules bloque la migration des interneurones sur des cultures d'explants (Marín et al., 2001).

Plus récemment, les *Ephrines* ont été identifiées comme signaux additionnels empêchant l'entrée des interneurones en migration dans le striatum en développement (Rudolph et al., 2010).

Enfin, un rôle régulateur des *Chémokines* a été identifié dans la régulation de la migration des interneurones. En effet, les interneurones expriment un récepteur des *Chémokines* : CXCR4 (Stumm et al., 2003). Des analyses ont montré que les interneurones en migration des souris déficientes pour le gène CXCR4 ont une préférence réduite pour les voies de migration dans la zone sous ventriculaire, intermédiaire et marginale corticales, et qu'ils envahissent prématurément la plaque corticale (Li et al., 2008; López-Bendito et al., 2008; Tiveron et al., 2006).

Ainsi, des molécules secrétées par d'autres cellules régulent, de façon indirecte, la migration des interneurones.

La migration neuronale corticale est donc un processus hautement régulé. Toute altération dans ce processus peut engendrer des anomalies de migration aboutissant le plus souvent à des malformations corticales, et c'est ce point que nous allons aborder maintenant.

II/ Malformations corticales liées à des défauts de migration neuronale.

Le développement du cortex cérébral résulte d'un ensemble de processus moléculaires et cellulaires remarquablement complexes intervenant tout au long de l'embryogenèse.

Toute altération de ces processus, d'ordre génétique ou environnemental, peut être à l'origine d'un large spectre de malformations du développement cortical, variables selon le mécanisme en cause et le stade de survenue des troubles. Les malformations du développement cortical sont actuellement reconnues comme une cause majeure d'épilepsie réfractaire de l'enfant et sont également responsables de déficits neurologiques et/ou de retard mental. Les études récentes ont conduit à une meilleure compréhension des mécanismes déterminant le développement du cortex cérébral et à la découverte de gènes impliqués dans certaines formes de malformations corticales. Les techniques d'imagerie récentes telles que l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) ont considérablement fait évoluer leur connaissance et constituent la base des classifications actuellement utilisées en clinique. La visualisation d'amas de neurones anormalement placés par imagerie a amené l'idée que des défauts de migration neuronale sont à l'origine des malformations corticales et d'une grande partie des défauts fonctionnels observés chez les enfants. Des études génétiques ont identifié de nombreux gènes qui peuvent altérer la migration neuronale pendant le développement cérébral, engendrant ainsi ce type de pathologies (Andrade, 2009; Guerrini and Parrini, 2010; Spalice et al., 2009; Verrotti et al., 2010). Les formes les plus communes des malformations corticales liées à des défauts de migration neuronale sont décrites dans les paragraphes suivants.
A. Les dysplasies corticales focales.

Le terme de dysplasie corticale focale (DCF) regroupe un large spectre d'altérations de la structure laminaire corticale généralement associées à des anomalies cytologiques incluant des neurones dits « géants », des neurones dysmorphiques et des cellules « en ballon » ou à des neurones anormalement localisés dans la substance blanche (**Figure 15**) (Blümcke et al., 2011; Tassi et al., 2002).



Figure 15 : Caractéristiques histologiques des sous types de dysplasies focales corticales.

A. *Dysplasie architecturale* : caractérisée par une lamination corticale anormale : des neurones de la même forme et de la même taille sont parsemés dans le cortex. **B**. *Dysplasie cytoarchitecturale* : présence de clusters de neurones « géants » (flèches). **C**. *Dysplasie de Taylor avec des cellules « en ballon »* : les cellules ont un nucléole proéminent (flèche). **D**. *Dysplasie de Taylor avec des cellules « en ballon »* : des neurones dysmorphiques contiennent de nombreux neurofilaments dans leur cytoplasme (flèche). (Tiré de (Colombo et al., 2003)).

Les patients atteints de dysplasie corticale focale présentent des épilepsies focales sévères (Guerrini et al., 2008). Le tissu cérébral est en effet très épileptogène et il apparait une augmentation des récepteurs du glutamate et une diminution des récepteurs du GABA (Aronica et al., 2003; Cepeda et al., 2010; Crino et al., 2001; Spreafico et al., 1998; Spreafico et al., 2000).

Il a été suggéré que ces altérations corticales résulteraient d'anomalies de la migration, de la maturation et de la mort neuronale pendant le développement (Najm et al., 2007; Ying et al., 2005). Certaines formes de dysplasie corticale focale (celles avec des cellules « en ballon ») sont pathologiquement très similaires aux formes de sclérose tubéreuse, un autre type de pathologie où des cellules géantes sont aussi retrouvées (Becker et al., 2002; Grajkowska et

al., 2008). Etant donné la similarité cytoarchitecturale entre les dysplasies focales corticales et la sclérose tubéreuse, il a été proposé qu'une base génétique commune existe entre ces deux pathologies. Ainsi, plusieurs équipes ont proposé que le gène TSC1 (Tuberous Sclerosis Complex 1), retrouvé muté dans la sclérose tubéreuse, aurait un rôle dans la pathogenèse des dysplasies corticales focales (Becker et al., 2002; Grajkowska et al., 2008). Cette idée reste cependant encore controversée puisque tous les patients atteints de dysplasie n'ont pas de mutation dans le gène TSC1 (Gumbinger et al., 2009).

B. Les polymicrogyries.

Le terme de polymicrogyrie est utilisé pour désigner la présence d'un nombre excessif de circonvolutions dont la taille anormalement petite donne un aspect irrégulier à la surface corticale. Les polymicrogyries peuvent être localisées seulement dans une portion d'un seul hémisphère ou bilatéralement dans les deux hémisphères, de façon symétrique ou non (**Figure 16**) (Barkovich, 2010).



Figure 16 : IRM d'un patient atteint de polymicrogyrie périsylvienne bilatérale.

La fissure périsylvienne est ouverte et le cortex périsylvien est plus fin et irrégulier. (Tiré de (Guerrini and Parrini, 2010)).

Plus de 87% des patients atteints de polymicrogyries présentent des épilepsies (Barkovich, 2010; Guerrini and Filippi, 2005). La pathogenèse de ce désordre neurologique est encore mal connue. Les études histologiques réalisées chez les patients ont montré un développement anormal et une perte des neurones au niveau des couches médianes et profondes du cortex cérébral (Barkovich, 2010). A ce jour, la polymicrogyrie a été associée à des mutations dans

plusieurs gènes : SRPX2 (sushi-repeat containing protein, X-linked 2) (Roll et al., 2006), PAX6 (paired box gene 6) (Glaser et al., 1994), TBR2 (T-box homeobox gene 2) (Baala et al., 2007), KIAA1279 (KIF1-binding protein homolog) (Brooks et al., 2005), RAB3GAP1 (RAB3 GTPase activating protein subunit 1) (Aligianis et al., 2005), COL18A1 (collagen, type XVIII, alpha 1) (Kliemann et al., 2003), GPR56 (G protein-coupled receptor 56) (Piao et al., 2004), TUBB2B (tubulin, beta 2B class IIb) (Jaglin et al., 2009), TUBA1A (tubulin, alpha 1a) (Jansen et al., 2011). De part la localisation anormale des neurones au sein du cortex, il a été proposé que ces anomalies résulteraient d'un défaut de migration neuronale. *Jaglin et al.*, en 2009, ont montré, par exemple, que l'inactivation *in utero* du gène TUBB2B entrainent des défauts de migration des neurones glutamatergiques corticaux, renforçant l'idée que des altérations de la migration neuronale seraient à l'origine des polymicrogyries (Jaglin et al., 2009).

C. Les schizencéphalies.

La schizencéphalie est caractérisée par une fente congénitale séparant l'hémisphère ou les hémisphères de la surface piale au ventricule latéral, bordée de cortex normal ou polymicrogyrique (**Figure 17**) (Granata et al., 2005).



Figure 17 : IRM d'un patient atteint de schizencéphalie.

Une large fente (à gauche) est observée avec un cortex polymicrogyrique bordant la fente. (Tiré de (Andrade, 2009)).

Les patients atteints de schizencéphalie présentent des troubles moteurs, une épilepsie et un retard psychomoteur à des degrés divers selon l'étendue de la fente (Granata et al., 2005). A

ce jour, l'origine de cette pathologie reste encore incertaine bien que des facteurs génétiques soient suspectés. Une mutation du gène EMX2 (empty spiracles homeobox 2), un facteur de transcription à homéobox, a été décrite dans des formes sporadiques et familiales de schizencéphalie (Brunelli et al., 1996; Granata et al., 1997). Ce gène, exprimé dans les progéniteurs neuronaux, semble jouer un rôle dans la migration neuronale (Granata et al., 1997). Cependant, son implication dans les schizencéphalies est encore controversée à ce jour (Merello et al., 2008).

D. Les hétérotopies.

Les hétérotopies sont des amas de neurones anormalement placés (ou hétérotopiques). Les formes d'hétérotopies les plus fréquentes sont les hétérotopies nodulaires périventriculaires. Cette pathologie est caractérisée par des masses nodulaires de matière grise contenant des neurones et des cellules gliales anormalement localisées le long des ventricules (**Figure 18**) (Ferland et al., 2009; Sheen et al., 2001).



Figure 18 : Patients atteints d'hétérotopie nodulaire périventriculaire.

A. IRM d'un patient montrant les nodules caractéristiques en bordure du ventricule (flèches) (Tiré de (Lu and Sheen, 2005)). **B.** Apparence macroscopique des nodules hétérotopiques le long du ventricule (flèches) d'un cerveau post mortem d'un enfant de 3 mois (Tiré de (Carabalona et al., 2011, voir Annexe 2)). **C.** Marquage hématoxyline-éosine d'une coupe du cerveau en **B** qui montre les nodules en bordures du ventricule (flèches) (Tiré de (Carabalona et al., 2011, voir Annexe 2)).

Environ 72% des patients atteint d'hétérotopies nodulaires périventriculaires présentent des épilepsies (Parrini et al., 2006). Une origine génétique est également suspectée pour ce type de pathologies. Deux gènes ont été retrouvés mutés dans ces pathologies :

- Des mutations dans le gène ARFGEF2 (ADP-ribosylation factor guanine nucleotideexchange factor 2) ont été reportées dans une forme rare et récessive d'hétérotopie nodulaire périventriculaire (Sheen et al., 2004).

- Des mutations dans le gène FLNA1 (FilaminA 1), ont été retrouvées dans les formes les plus communes d'hétérotopies nodulaires périventriculaires, qui touchent principalement les femmes (Fox et al., 1998; Sheen et al., 2001). Plus de 50% des patientes atteintes de ce type de syndrome possèdent une mutation de ce gène (Fox et al., 1998; Parrini et al., 2006). Ces patientes présentent des retards mentaux plus ou moins marqués ainsi que des épilepsies (Fox et al., 1998; Sheen et al., 2001). Il a été montré que l'orthologue du gène FlnA chez la souris est exprimé dans le soma et les prolongements de guidage des neurones en migration (Sheen et al., 2002). De plus, le gène FlnA, impliqué dans la régulation du cytosquelette des cellules (Stossel et al., 2001), régulerait la polarité et la motilité des neurones des zones sous ventriculaire et intermédiaire corticales au cours de la migration radiaire (Nagano et al., 2004). Des défauts de migration neuronale seraient à l'origine de ces amas de neurones ectopiques. J'ai eu la chance, au cours de ma thèse, de pouvoir travailler, en parallèle de mon étude, sur le rôle du gène FlnA1 dans le développement cortical (Voir Annexe 2). Dans cette étude, mon équipe a, entre autre, montré par des expériences d'électroporation in utero chez le rat, que l'inactivation du gène FlnA spécifiquement dans les progéniteurs des neurones de la zone ventriculaire corticale, entraine une désorganisation de la glie radiaire, altérant ainsi la progression du cycle cellulaire des précurseurs neuronaux et la migration radiaire de ces neurones vers la plaque corticale (Carabalona et al., voir Annexe 2). Ces données renforcent ainsi le rôle du gène FlnA dans l'organisation de la glie radiaire, dans la neurogenèse et dans la migration des neurones et consolident l'idée que les hétérotopies nodulaires chez l'homme sont liées à des défauts de migration.

E. Les lissencéphalies.

La lissencéphalie est la forme la plus sévère de malformation corticale résultant d'une anomalie de migration neuronale. Littéralement le mot lissencéphalie signifie « cerveau lisse » puisque cette pathologie est caractérisée par une absence de circonvolutions (ou gyri) à la surface du cerveau. Cette malformation a des degrés de sévérité variable allant d'une absence totale de circonvolutions (agyrie) à une réduction partielle (pachygyrie), généralement associée à une lamination anormale du cortex qui est seulement organisé en quatre couches corticales au lieu de six normalement et parfois associée à une bande de neurones ectopiques sous corticales (pour revue voir (Kato and Dobyns, 2003)). Il existe cinq classes de lissencéphalies : les lissencéphalies dites « classiques », les lissencéphalies pavimenteuses (où la surface du cortex est irrégulière (comme des « pavés »), et les couches corticales sont complètement désorganisées), les lissencéphalies avec hypoplasie du cervelet, les microlissencéphalies (lissencéphalie associée à une microcéphalie) et les lissencéphalies avec agénésie du corps calleux (**Figure 19**) (Verrotti et al., 2010).

A ce jour plusieurs gènes mutés ont été associés à différentes formes de lissencéphalies :

- LIS1 (lissencephaly-1 gene)(Cardoso et al., 2002; Reiner et al., 1993), DCX (doublecortin) (Pinard et al., 1994), TUBA1A (tubulin, alpha 1a) (Poirier et al., 2007) pour les formes classiques.

 POMT1 (protein-O-mannosyltransferase 1), POMGnT1 (protein O-linked mannose beta1,2-N-acetylglucosaminyltransferase), FKTN (fukutin), FKRP (fukutin related protein), pour les lissencéphalies pavimenteuses (pour revue voir (Van Reeuwijk et al., 2005)).

- RELN (reelin) et VLDLR (very low density lipoprotein receptor) pour les lissencéphalies avec hypoplasie du cervelet (Hong et al., 2000).

- ARX (aristaless related homeobox gene) pour les lissencéphalies avec agénésie du corps calleux (Bienvenu et al., 2002; Kitamura et al., 2002; Stromme et al., 2002).



Figure 19 : IRM de patients atteints de lissencéphalies.

A. Agyrie liée à une mutation du gène LIS1 avec un cortex très fin et une perte complète de circonvolutions. **B**. Pachygyrie liée à une mutation du gène LIS1. **C**. Lissencéphalie avec une bande hétérotopique de neurones (flèches) liée à une mutation du gène DCX. **D**. Lissencéphalie avec absence du corps calleux liée à une mutation du gène ARX. **E**. Lissencéphalie liée à une mutation du gène RELN avec hypoplasie du cervelet (non montré). (Tiré et adapté de (Guerrini et al., 2007)).

Les lissencéphalies classiques liées aux mutations des gènes LIS1 et DCX ont probablement été les plus étudiées. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que le gène LIS1, nécessaire à la dépolymérisation des microtubules, semble nécessaire pour la migration neuronale corticale (Gambello et al., 2003; Hirotsune et al., 1998), et plus précisément pour les mouvements du noyau pendant la migration (Tanaka et al., 2004). Le gène DCX, quant à lui, est exprimé dans les neurones en migration et semble nécessaire à la polymérisation des microtubules : il pourrait ainsi jouer un rôle dans les mouvements des cellules pendant la migration neuronale (Francis et al., 1999; Gleeson et al., 1999). Les avancées technologiques permettant de visualiser la migration des neurones sur des cultures de coupes de cerveaux embryonnaires ou bien après électroporation *in utero* ont montré que les gènes LIS1 et DCX sont requis pour la migration neuronale et les mouvements nucléaires (**Figure 20**) (Bai et al., 2003; Shu et al., 2004; Tsai et al., 2005).



Figure 20 : Inactivation des gènes LIS1 et DCX par électroporation in utero.

A. Coupe coronale d'un cerveau de rat 4 jours après une électroporation *in utero* dans la zone ventriculaire corticale réalisée à E16 avec un vecteur contrôle (à droite) ou un vecteur contenant un ShRNA pour inactiver le gène LIS1 (à gauche). L'inactivation du gène LIS1 aboutit à un défaut de migration des cellules pyramidales (Tiré et adapté de (Tsai et al., 2005)). **B.** Coupe coronale d'un cerveau de rat 4 jours après une électroporation *in utero* de la zone ventriculaire corticale réalisée à E14 avec un vecteur contrôle (à droite) ou un vecteur contenant un ShRNA pour inactiver le gène DCX (à gauche). L'inactivation du gène DCX aboutit à un défaut de migration des cellules pyramidales (Tiré et adapté de (Bai et al., 2003)).

L'étude du rôle de ces gènes a permis d'élucider plus précisément les mécanismes engendrant les épilepsies observées chez les patients. Par exemple, les souris déficientes pour le gène LIS1 présentent, comme les patients, des épilepsies (Greenwood et al., 2009). L'équipe de *Greenwood* a montré une homéostasie anormale de la balance excitation/inhibition du réseau neuronal avec une augmentation de l'excitation glutamatergique associée à une augmentation du nombre de vésicules présynaptiques (Greenwood et al., 2009). De la même façon, l'analyse d'un modèle de rats déficients pour le gène DCX par électroporation *in utero* a permis de montrer que les altérations de la migration neuronale suite à l'inactivation du gène, en plus d'altérer l'excitabilité des neurones qui n'ont pas migré, altèrent aussi la zone dans laquelle ils auraient du être (Ackman et al., 2009).

Enfin, les mutations du gène RELN (qui code pour la *Reelin* : une glycoprotéine secrétée pendant le développement embryonnaire) ont été retrouvées dans les formes de lissencéphalies avec hypoplasie de cervelet (Hong et al., 2000). La *Reelin* aurait ainsi un rôle crucial dans la régulation de la migration neuronale pendant le développement cortical (Chang et al., 2007). Des souris mutantes pour le gène Reln (*reeler mice*) présentent une lamination corticale anormale (pour revue voir (D'Arcangelo, 2006)). De plus, ces souris sont plus susceptibles aux crises d'épilepsie et présentent une distribution anormale des cellules dans l'hippocampe (Patrylo and Willingham, 2007; Patrylo et al., 2006).

Avec les progrès technologiques de ces dernières années au niveau des techniques d'imagerie, de génétiques et d'expérimentations, des avancées considérables ont été faites concernant l'étude des malformations corticales liées à des anomalies de la migration neuronale. Certains gènes ont ainsi pu être identifiés, et l'étude de ces gènes a permis d'élucider plus précisément les mécanismes sous tendant les défauts de migration neuronale et les épilepsies, permettant une meilleure compréhension de la migration neuronale et du développement correct du cortex cérébral. Parmi ces gènes, le gène ARX, retrouvé muté, comme évoqué précédemment, dans un type de lissencéphalie, nous a particulièrement intéressé au cours de cette étude. Par le passé, un certain nombre de travaux ont été réalisés pour comprendre le rôle de ce gène au cours du développement et c'est ce que nous allons aborder dans les prochaines pages de cette introduction.

III/ Le gène ARX : description générale.

A. Historique.

1. Première caractérisation chez les vertébrés.

De nombreux gènes homologues à des gènes impliqués dans le développement de la *Drosophile* participent à la spécification régionale du cerveau en développement des vertébrés. L'existence de tels gènes homologues souligne le fait que les mécanismes moléculaires de la formation du cerveau sont hautement conservés entre les différentes espèces (Finkelstein and Boncinelli, 1994). Etant donné que la structure du cerveau des vertébrés est beaucoup plus complexe que celle de la *Drosophile*, les chercheurs ont suggéré l'existence de gènes additionnels spécifiques participant au mécanisme de formation du cerveau chez les vertébrés. Dans le but d'identifier de tels facteurs, un nouveau gène a été isolé et caractérisé par hybridation *in situ* par l'équipe du *Dr Kitamura* au Japon en 1997 (Miura et al., 1997). Ce gène, hautement similaire au gène al chez la Drosophile impliqué dans la morphogénèse des appendices (Schneitz et al., 1993), a été nommé Arx (*aristaless* related homeobox gene) pour sa similarité structurale avec ce dernier.

2. Identification du gène chez l'homme.

En parallèle des études réalisées par le *Dr Kitamura* chez la souris et le poisson-zèbre, des équipes s'intéressant aux syndromes liant retard mental et épilepsie cherchaient à identifier le gène impliqué dans ce type de pathologie. Comme les retards mentaux touchent préférentiellement les garçons, et parce que les causes de ces types de syndromes peuvent être génétiques, des analyses plus précises des gènes localisés sur le chromosome X ont été réalisées. Ainsi, un intervalle critique du chromosome X chez l'Homme localisé dans la région Xp21.3-Xp22.1 a été identifié, et il a été proposé que cette région puisse renfermer un ou plusieurs gènes nécessaires au développement et à la fonction du cerveau (Bruyere et al., 1999; Claes et al., 1997; Strømme et al., 1999). Des informations disponibles dans différentes bases de données, les données de la littérature et des analyses *in silico* ont permis l'identification et la caractérisation d'une 10^{aine} de gènes dans cette région (Bienvenu et al., 2002; Ohira et al., 2002; Stromme et al., 2002). Les analyses se sont ensuite restreintes aux

gènes exprimés dans le cerveau fœtal humain. Le gène ARX a été identifié chez l'Homme, par sa similitude de séquence et de pattern d'expression au niveau du cerveau avec le gène murin (Bienvenu et al., 2002; Ohira et al., 2002; Stromme et al., 2002). C'est ainsi que l'étude de plusieurs familles atteintes de retard mental et d'épilepsie a permis d'identifier des mutations dans le gène ARX, faisant de ce gène un très bon candidat pour les formes familiales de retard mental et d'épilepsie liées au chromosome X (Bienvenu et al., 2002; Ohira et al., 2002; Stromme et al., 2002; Stromme et al., 2002; Ohira et al., 2002; Stromme et al., 2002; Stromme et al., 2002; Ohira et al., 2002; Stromme et al., 2002; Stromme et al., 2002; Ohira et al., 2002; Stromme et al., 2002

B. Caractéristiques du gène et de la protéine

Le gène ARX (GenBank : NM_139058.2) appartient à la famille des gènes liés à Aristaless, un sous groupe des gènes à homéobox de type *paired* (Prd). Ces gènes semblent être des régulateurs importants des étapes essentielles de l'embryogénèse des vertébrés, incluant le développement du système nerveux central et périphérique (Meijlink et al., 1999). Ce gène s'étend sur environ 12,5Kb d'ADN génomique au niveau de la région Xp22 du chromosome X. Ses cinq exons donnent naissance à un cadre de lecture ouvert de 1686 paires de bases aboutissant à une protéine prédictive de 562 acides aminés (**Figure 21**) (Gecz et al., 2006).





(En haut) Structure exon-intron du gène ARX avec les 5 cadres d'exon en violet, le cadre ouvert de lecture en noir, la position des codons ATG et STOP, les régions 5'-3' non transcrites en gris clair, les paires de bases correspondant à chaque exon. (En bas) Structure de la protéine prédictive *ARX* avec les domaines fonctionnels connus : Octapeptide (OP, en vert), trois séquences de localisation nucléaire (NLS, en bleu), quatre domaines polyalanine (PA, en rose), le domaine acidique (en beige), l'homéodomaine (en orange), et le domaine aristaless (en marron), avec les acides aminés correspondant sous chaque domaine. (Inspiré de (Friocourt and Parnavelas, 2010; Shoubridge et al., 2010)).

La protéine est caractérisée par plusieurs domaines importants:

- 1) L'<u>Homéodomaine de type *paired*/Q50</u> (renferme une glutamine en position 50) qui est 100% homologue avec l'homéodomaine de la protéine *Arx* murine. Ce domaine a la capacité de se lier à l'ADN sur la séquence TAATTA (Fulp et al., 2008). Il aurait un rôle dans la répression de la transcription (Mailhos et al., 1998).

- 2) <u>Le domaine Aristaless</u> en C-terminal qui est aussi hautement conservé entre les espèces. Sa fonction est inconnue mais il aurait un rôle dans l'activation de la transcription (McKenzie et al., 2007).

- 3) <u>L'Octapeptide</u> (OP) en N-terminal qui est lui aussi hautement conservé entre les espèces. Il aurait une fonction de répression de l'activité de transcription (Fullenkamp and El-Hodiri, 2008; Mailhos et al., 1998; McKenzie et al., 2007).

- 4) Le domaine acide pour lequel aucune fonction n'a été attribuée pour le moment.

- 5) <u>Quatre domaines polyalanine (PA)</u> qui, de façon intéressante, ne sont pas 100% homologues entre l'Homme et la souris. Leur fonction est inconnue bien qu'il ait été suggéré un rôle dans la répression de la transcription (Han and Manley, 1993).

- 6) <u>Trois séquences de localisation nucléaire (NLS)</u>, essentielles pour l'importation de la protéine dans le noyau, notamment les séquences NLS2 et NLS3 (Lin et al., 2009; Shoubridge et al., 2010).

De façon intéressante, ce gène est hautement conservé entre les espèces (**Table 1**). Ceci souligne donc son importance au sein des organismes.

Espèce	Nom du gène	% d'homologie de l'homédomaine	% d'homologie de séquence	Références
Drosophile	al	81% avec le gène alr-1		Melkman et al., 2005
C. Elegans	air-1	81% avec le gène <i>al ,</i> 79% avec le gène <i>ARX</i> humain		Melkman et al., 2005
Xénope	xArx		59-64% d'identité avec les acides aminés des autres protéines Arx des vertébrés	El-Hodiri et al., 2003
	xArx2		90% d'identité avec les acides aminés de la protéine <i>xArx</i>	Wolanski et al., 2009
Poisson-zèbre	Arx	85% avec le gène <i>al</i> , hautement conservé avec la gène <i>Arx</i> de la souris		Miura et al., 1997
Souris	Arx	85% avec le gène <i>al ,</i> hautement conservé avec la gène <i>Arx</i> du poisson zèbre		Miura et al., 1997
Homme	ARX	79% avec le gène alr-1 chez C.Elegans	89% de nucléotides identiques avec la séquence du gène <i>Arx</i> chez la souris, 98% de similarité avec la protéine chez la souris	Melkman et al., 2005; Ohira et al., 2002

Table 1 : Homologie de séquence du gène ARX et de ses orthologues.

Pourcentage d'homologie de l'homéodomaine et des séquences nucléotidiques et protéiques entre les différentes espèces.

C. Expression d'Arx et fonction dans les différents organes.

Arx est exprimé dans les muscles squelettiques, l'appareil génital, le pancréas, le cerveau, ainsi que le cœur (**Figure 22**) (Bienvenu et al., 2002; Collombat et al., 2003; Colombo et al., 2004; Kitamura et al., 2002; Ohira et al., 2002). Cependant, à ce jour, aucune étude n'a été réalisée concernant son rôle au niveau du cœur.



Figure 22 : Expression du transcrit du gène ARX chez la souris et l'homme.

A. Hybridation *in situ* d'embryons de souris à E9.5 montrant l'expression du transcrit d'Arx dans le pancréas. **B.** Grossissement de la zone en A, montrant l'expression du transcrit dans le pancréas (flèche). **C.** Hybridation *in situ* réalisée sur des embryons de souris à E9 montrant l'expression du transcrit d'Arx dans le cerveau (flèche). **D.** Northern Blot réalisé sur des tissus humains adultes (à gauche) et fœtaux (à droite) montrant l'expression du transcrit d'ARX dans les muscles squelettiques, le pancréas, le cerveau, ainsi que le cœur. (D'après (Bienvenu et al., 2002; Collombat et al., 2003)).

Voici un récapitulatif des travaux réalisés sur l'expression d'*Arx* et sa fonction dans les différents organes :

1. ARX et muscle squelettique

Les muscles squelettiques sont les muscles striés du corps. Leur développement se réalise par des phases distinctes :

- i) la myogenèse primaire (à E10.5-E12.5 chez la souris) où les myoblastes (formés à partir de progéniteurs dérivés du mésoderme) fusionnent et génèrent des fibres primaires.
- ii) la myogenèse secondaire, plus tardive (à E14.5-E17.5 chez la souris), où les fibres secondaires sont générées.

Ces différentes phases sont finement régulées par des facteurs de régulation myogénique. Ainsi les gènes *Myf5*, *MyoD* et *Mrf4* initient de façon indépendante le programme myogénique de la myogenèse primaire alors que seulement les gènes *Myf5* et *MyoD* ont un rôle dans la myogenèse secondaire. Un autre facteur de régulation myogénique, le gène *Myogenin* est régulé par les gènes *Myf5*, *MyoD* et *Mrf4* (pour revue, voir (Pownall et al., 2002; Tajbakhsh and Buckingham, 2000). Des facteurs de transcription additionnels sont également requis pour réguler la spécificité de ces gènes de détermination myogénique. Ainsi, le gène MEF2 est capable de moduler ces facteurs et engendre une régulation positive ou négative de la différenciation musculaire (pour revue, voir (Sabourin and Rudnicki, 2000)).

Le gène ARX est exprimé au niveau des muscles squelettiques chez l'homme (Bienvenu et al., 2002; Ohira et al., 2002) mais aussi dans les muscles chez la souris en développement (Biressi et al., 2008). *Arx* est exprimé dans les myoblastes embryonnaires durant la myogenèse primaire, et son expression est beaucoup plus faible dans les myoblastes adultes (**Figure 23**) (Biressi et al., 2008).



Figure 23 : Expression d'Arx dans les muscles chez la souris à différents stades de développement. Expérience réalisée par PCR en temps réel sur des embryons de souris à E11.5, E16.5 et adultes. Les résultats sont normalisés par rapport à l'expression du gène 🛙 actine spécifique des muscles. (Tiré de (Biressi et al., 2008)).

Ainsi, *Biressi et al.* ont suggéré que ce facteur aurait un rôle dans les différentes populations myogéniques et ont réalisé des études afin de clarifier sa fonction pendant le développement des muscles squelettiques (Biressi et al., 2008). Cette équipe a montré quatre points importants :

- i) L'expression d'Arx est régulée par les facteurs MyoD, Myf5 et Mrf4. (L'expression d'Arx est indétectable chez des souris où l'expression de ces facteurs est abolie).
- ii) Arx module de façon positive la différenciation des muscles squelettiques. (La surexpression de ce gène dans une lignée de cellules myoblastes entraine une accélération de leur différenciation et les souris déficientes pour le gène Arx ont un retard dans la myogenèse).
- iii) ARX agit en coopération avec les facteurs *MyoD* et *Mef2C* dans l'induction du programme myogénique par l'activation de gènes spécifiques tels que *Myogenin*.
- iv) ARX établit une boucle positive de régulation avec le gène Myogenin.

Un schéma de la hiérarchie des gènes gouvernants la différenciation embryonnaires des muscles squelettiques a ainsi été établi (Figure 24).



Figure 24 : Hiérarchie des gènes impliqués dans la différenciation embryonnaires des muscles squelettiques.

Arx et *Mef2C* (en rouge) sont exprimés de façon prédominante dans les myoblastes embryonnaires. *Arx* agit en coopération avec *Mef2C* et *MyoD* dans l'activation du gène *Myogenin*. *Arx* et *Myogenin* participe ensemble à une boucle de régulation positive dans les myoblastes embryonnaires en différenciation. Les flèches représentent les relations génétiques mais pas nécessairement les interactions directes. (Tiré de (Biressi et al., 2008)).

2. ARX et appareil génital

Durant les stades précoces de la formation des gonades chez l'individu masculin, le mésoderme intermédiaire se développe pour donner naissance, entre autres, aux cellules de Sertoli (qui dirigent la prolifération et la différenciation des cellules germinales durant la spermatogénèse) et les cellules de Leydig (qui sont responsables de la production de la testostérone) (Ross and Capel, 2005). Ces cellules, générées suite à l'activation de voies de signalisation spécifiques sont nécessaires au bon fonctionnement de l'appareil génital masculin (Ross and Capel, 2005).

En 2002, *Kitamura et al.* ont généré des souris knock-out pour le gène Arx (Kitamura et al., 2002). Les souris mâles, chez lesquelles le gène Arx est absent, présentent entre autres, des défauts de l'appareil génital. En effet, les testicules de ces souris sont plus petits et possèdent des tubes séminifères de diamètre supérieur comparé à des souris sauvages (**Figure 25 A-B**). De plus, leur vésicule séminale est beaucoup plus petite (**Figure 25 C**) (Kitamura et al., 2002). Ils ont aussi observé une diminution de l'expression de *Hsd3b1*, marqueur

spécifique des cellules de Leydig, chez les souris déficientes pour le gène Arx (**Figure 25 D-E**) (Kitamura et al., 2002).



Figure 25 : Comparaison de l'appareil génital de souris sauvages et déficientes pour le gène Arx. Le testicule de souris sauvages (A) est plus grand que celui des souris déficientes pour le gène Arx (B), alors que le diamètre des tubes séminifères des souris déficientes est beaucoup plus large que celui des souris sauvages. C. La vésicule séminale des souris mutantes (à droite) est hypoplasique comparée à celle des souris sauvages (à gauche). **D-E**. Expression de *Hsd3b1*, marqueur spécifique des cellules de Leydig chez les souris sauvages et déficientes pour le gène Arx. Les flèches indiquent les cellules de Leydig. (A-C) Barres d'échelle : 200µm. (D-E) Barre d'échelles : 50µm. (Tiré de (Kitamura et al., 2002)).

Cette même équipe a également identifié des mutations dans le gène ARX chez des individus atteints d'une forme particulière de lissencéphalie avec anormalité génitale, le syndrome XLAG (X-linked lissencephaly with abnormal genitalia)(Kitamura et al., 2002). Ces patients présentent, entre autres, une ambigüité génitale ou un appareil génital peu développé (Bonneau et al., 2002; Dobyns et al., 1999; Kitamura et al., 2002). De plus, une réduction du nombre de cellules de Leydig et de la concentration en testostérone est aussi observée chez des individus atteints de ce syndrome (Ogata et al., 2000).

Le phénotype de l'appareil génital des souris déficientes pour le gène Arx et celui des patients XLAG est donc similaire. Ainsi, un dysfonctionnement des cellules de Leydig pourrait être la cause de l'ambiguïté génitale chez les patients XLAG et de l'hypoplasie des vésicules séminales chez les souris déficientes pour le gène Arx. *Arx* n'est pourtant pas

exprimé au niveau des cellules de Leydig, mais le fait que le marqueur spécifique de ces cellules soit diminué chez les souris déficientes pour ce gène suggère qu'il agirait via une voie de signalisation paracrine nécessaire à la différenciation des cellules de Leydig (Brennan and Capel, 2004; Kitamura et al., 2002).

3. ARX et pancréas

Le pancréas est constitué de deux tissus glandulaires étroitement associés (Johansson and Grapin-Botton, 2002; Murtaugh, 2007) :

- i) Une glande acineuse formée de cellules exocrines qui sécrètent des enzymes dans l'intestin.
- ii) Une glande formée de cellules endocrines qui sécrètent des hormones dans le sang.
 Elle est constituée de cinq types cellulaires différents (α, β, δ, ε, PP) regroupés dans les îlots de Langerhans. Ces cellules produisent respectivement les hormones suivantes : glucagon, insuline, somatostatine, ghrelin et le polypeptide pancréatique.

Le développement de cet organe se réalise à partir de l'endoderme de l'embryon par un processus complexe incluant la formation des bourgeons pancréatiques puis leur fusion, la différenciation des cellules exocrines et endocrines du pancréas, et la migration de ces dernières pour former les îlots de Langerhans (Johansson and Grapin-Botton, 2002). Un nombre important de régulateurs transcriptionnels jouent un rôle primordial dans le contrôle de la spécification des cellules pancréatiques (pour revue, voir (Murtaugh, 2007)).

En 2003, *Collombat et al.* ont montré, par hybridation *in situ*, que le gène Arx est exprimé au niveau du pancréas à partir de E9.5 chez la souris (Collombat et al., 2003). Les cellules exprimant *Arx* sont retrouvées tout au long de la mise en place de cet organe : au cours de la prolifération de l'épithélium, de la différenciation des précurseurs pancréatiques, pour se restreindre ensuite dans les îlots de Langerhans, suggérant un rôle de ce gène dans le développement des cellules endocrines (Collombat et al., 2003). Le pancréas des souris déficientes pour le gène Arx présente une perte de cellules α matures et une augmentation proportionnelle du nombre de cellules β et δ (Collombat et al., 2003). Ces changements phénotypiques sont complètement opposés à ceux observés chez des souris déficientes pour le gène Pax4. Les gènes Arx et Pax4 agiraient de façon opposé dans le développement du pancréas endocrine (Collombat et al., 2003). Ils ont en effet une interaction directe et sont responsables de leur inhibition transcriptionnelle mutuelle (Collombat et al., 2003; Collombat et al., 2005) (**Figure 26**).



Figure 26 : Représentation schématique des facteurs de transcription impliqués dans la spécification du pancréas endocrine.

Les cercles représentent les cellules endocrines au cours du développement du pancréas. Les différents facteurs de transcription exprimés dans un type cellulaire particulier sont indiqués dans les cercles. (Tiré de (Collombat et al., 2003)).

Depuis, plusieurs études ont été réalisées pour approfondir le rôle d'Arx dans le développement du pancréas, et il a été montré plusieurs points importants :

- Le gène Arx est nécessaire et suffisant pour induire la spécification des cellules α (Collombat et al., 2007).

- Arx est un médiateur de l'effet de l'*Activin A* (qui affecte l'expression du gène glucagon et la prolifération des cellules α) sur la prolifération cellulaire des cellules α (Mamin and Philippe, 2007).

- Le gène Arx est méthylé et réprimé dans les cellules β (Dhawan et al., 2011).

- Le gène Islet-1 (un facteur de transcription impliqué dans le développement des îlots de Langerhans) est un activateur de la transcription d'Arx durant le développement des cellules α (Liu et al., 2011).

- Une interaction génétique entre les gènes Arx et Nkx2.2 (essentiel pour la différenciation des cellules α et β) est nécessaire dans le développement des cellules PP et pour l'expression des hormones endocrines grhelin et somatostatine (Mastracci et al., 2011).

- Arx a besoin de l'activité du gène Nkx2.2 pour maintenir les cascades de signalisation initiées dans les précurseurs des cellules α (Kordowich et al., 2011).

- Les fonctions couplées de Nkx2.2 et Pax4 contrôlent l'activité du gène Arx dans les précurseurs des cellules β (Kordowich et al., 2011).

L'ensemble de ces travaux a permis de montrer l'importance du gène Arx au cours de la mise en place du pancréas et d'affiner la hiérarchie des différents facteurs de transcription impliqués au cours du développement pancréatique (**Figure 27**) (Granata et al., 2010).



Figure 27 : Représentation schématique réévaluée et non exhaustive de la hiérarchie des facteurs de transcription impliqués dans la spécification des cellules endocrines.

Les flèches noires indiquent les voies de signalisation génétique bien établies pour la différenciation des différents sous type cellulaire. Les flèches rouges représentent les hypothétiques voies de signalisation. NEUROG3: neurogenin 3; PDX1: pancreatic and duodenal homeobox 1; NKX2.2: NK2 homeobox 2; NKX6.1: NK6 homeobox 1; PAX4: paired box gene 4; PAX6: paired box gene 6; NEUROD1: neurogenic differentiation 1; RFX6: regulatory factor X, 6; ARX: aristaless-related homeobox; ISL1: islet1. (tirée de (Granata et al., 2010).

De plus, des études réalisées sur des patients atteints du syndrome XLAG (X-linked lissencephaly with abnormal genitalia), chez lesquels le gene ARX est muté, ont montré une perte des cellules α et PP dans les îlots de Langerhans ainsi qu'une taille réduite des cellules exocrines (Itoh et al., 2010). Ces études suggèrent que le gène ARX contribuerait non seulement au développement du pancréas endocrine mais aussi au développement du pancréas exocrine chez l'Homme.

4. ARX et système nerveux

Le gène ARX et ses homologues sont également exprimés au sein du système nerveux, et c'est ce qui a été le plus étudié.

Chez *C. Elegans*, l'orthologue d'Arx, alr-1, a été caractérisé en 2005 (Melkman and Sengupta, 2005). Chez les larves et les adultes, *alr-1* est exprimé dans les cellules neuronales de la tête et de la queue, ainsi que dans des sous types de motoneurones GABAergiques de la corde nerveuse ventrale (Melkman and Sengupta, 2005). Il a été montré que ce gène régule le développement d'un sous type de neurones chimiosensoriels et qu'il joue un rôle dans la différenciation d'un sous type de motoneurones GABAergiques (Melkman and Sengupta, 2005). Alr-1 est également nécessaire au maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle des organes sensoriels pendant le développement de la larve (Tucker et al., 2005).

Chez le *Xénope*, le gène xArx, orthologue du gène Arx, a été isolé en 2003 (El-Hodiri et al., 2003). Il est exprimé dans le diencéphale et le télencéphale en développement où il régulerait l'expression de certains gènes (Seufert et al., 2005). Ce gène contribuerait à limiter l'expression antérieur des gènes Irx nécessaires à la formation du cerveau chez le *Xénope* (Rodriguez-Seguel et al., 2009). Un autre orthologue du gène Arx, xArx2 chez le *Xénope* a été identifié et régulerait la régionalisation du cerveau en développement (Wolanski et al., 2009).

Arx a été isolé et caractérisé pour la première fois chez la souris en 1997 (Miura et al., 1997). Des études ont montré qu'*Arx* est retrouvé chez la souris en développement au niveau des structures télencéphaliques comme les éminences ganglionnaires, le striatum, le thalamus ventral, le cortex cérébral et l'hippocampe, mais aussi dans le pont et la moelle épinière (aucune expression n'est détectée dans le cervelet) (Bienvenu et al., 2002; Colombo et al., 2004; Kitamura et al., 2002; Miura et al., 1997; Poirier et al., 2004).

Dans le cortex en développement, Arx est exprimé au niveau de la zone ventriculaire (contenant les cellules progénitrices), de la zone intermédiaire (contenant les interneurones en migration), et de la plaque corticale en développement (contenant les jeunes neurones mâtures) (Bienvenu et al., 2002; Friocourt et al., 2006; Kitamura et al., 2002; Poirier et al.,

2004) (**Figure 28**). Son expression est donc retrouvée à la fois dans les cellules en division et post-mitotiques.

Au niveau des éminences ganglionnaires au stade embryonnaire chez la souris, *Arx* est exprimé dans la zone intermédiaire (où les interneurones sont générés), mais pas dans la zone ventriculaire (Friocourt et al., 2006; Miura et al., 1997; Poirier et al., 2004)(**Figure 28**).



Figure 28 : Expression de la protéine Arx dans le cerveau embryonnaire de rat et souris.

A. Immunomarquage de la protéine *Arx* sur une coupe coronale de cerveau de rat à E16. *Arx* est exprimé au niveau du striatum et du cortex. Echelle : 50μm. (Tiré de (Friocourt et al., 2006)). **B**. Expression d'*Arx* dans le cortex de souris à E13.5. *Arx* est exprimé au niveau de la zone marginale, de la plaque corticale et la sous plaque, de la zone intermédiaire et des zones ventriculaire et sous ventriculaire. Echelle : 50μm. (Kitamura et al., 2002). **C**. Expression d'*Arx* dans le cortex de souris à E18.5. Les cellules exprimant *Arx* sont plus denses au niveau de la pie et de la zone marginale et parsemées dans les couches corticales. Echelle : 150μm. (Kitamura et al., 2002). **D**. Expression d'*Arx* dans le cortex de souris à P14. Les cellules exprimant *Arx* sont parsemées dans les différentes couches corticales (Tiré de (Kitamura et al., 2002)). Echelle : 150μm.

Chez la souris adulte et le rat, *Arx* est exprimé dans le cortex (de façon dispersé dans les différentes couches corticales), l'hippocampe (au niveau du gyrus denté), le thalamus ventral et dans les bulbes olfactifs (au niveau des couches granulaires, glomérulaires et mitrales) (Bienvenu et al., 2002; Colombo et al., 2004; Kitamura et al., 2002; Poirier et al., 2004) (**Figure 29**). Aucune expression n'est observée dans le cervelet (Bienvenu et al., 2002; Poirier et al., 2004).



Figure 29 : Expression de la protéine Arx dans le cerveau adulte de souris.

A-C. Expression d'*Arx* dans le cerveau de souris adulte. Immunomarquages réalisés sur des coupes coronales de cerveau de souris adulte (**A**), dans le cortex (**B**) et dans le gyrus denté (**C**) pour la protéine *Arx* (en vert) et le DAPI (en bleu). L'expression d'*Arx* est retrouvée parsemée dans le cortex, intense dans la couche granulaire du gyrus denté et parsemée dans la couche polymorphe du gyrus denté (x10). (Tiré de (Poirier et al., 2004)).

Il est intéressant de retenir que le gène Arx chez la souris et le rat est majoritairement exprimé dans les interneurones du cerveau en développement (Colombo et al., 2004; Kitamura et al., 2002) et que cette expression dans les interneurones est aussi maintenue à des stades adultes (Colombo et al., 2004; Poirier et al., 2004)(**Figure 30**).



Figure 30 : Expression d'Arx dans les interneurones corticaux et hippocampiques.

A-C. Distribution des cellules exprimant *Arx* (**A**, en vert) et des cellules positives pour le marqueur GABA (**B**, en rouge) dans le cortex de souris à E18.5. La plupart des cellules exprimant *Arx* dans la plaque corticale co-expriment le marqueur GABA alors que les cellules de la pie et de la zone marginale ne l'expriment pas. **C**. PIA : pie ; ZM : zone marginale ; CP : plaque corticale ; SP : sous plaque ; IZ : zone intermédiaire ; SVZ : zone sous ventriculaire ; VZ : zone ventriculaire. Echelles : 100μm (Tiré de (Kitamura et al., 2002)). **D-E.** Double marquage d'*Arx* (en bleu) et de GABA (en rouge) dans le cortex de souris adulte (**D**) ou dans l'hippocampe (**E**) (Colombo et al., 2004). **F.** Proportion des neurones GABAergiques corticaux exprimant *Arx* (en bleu) ou non (en rouge). La majorité des interneurones corticaux expriment *Arx*. (Tiré de (Colombo et al., 2004)).

Chez l'Homme, le gène ARX est également exprimé dans le cerveau à des stades fœtaux et adultes (Ohira et al., 2002). Des analyses par hybridation *in situ* ont montré qu'il est exprimé au niveau de la matrice germinale des éminences ganglionnaires, de la zone ventriculaire et sous ventriculaire corticale, de la plaque corticale, du noyau caudé, du putamen, du globus pallidus, de la substance noire, du cortex cingulaire et de l'hippocampe (Ohira et al., 2002)(**Figure 31**).



Figure 31 : Hybridation *in situ* pour le gène ARX sur une coupe coronale de cerveau fœtal humain à 22 semaines de gestation.

L'expression d'ARX est détectée dans la zone ventriculaire (VZ) et sous ventriculaire (SVZ) corticale, dans la zone germinatrice (gm) des éminences ganglionnaires, dans la plaque corticale (cp), le cortex cingulaire (ci), et l'hippocampe (h). (D'après (Ohira et al., 2002)).

Le pattern d'expression d'*Arx* dans le cerveau en développement est ainsi très similaire entre les espèces. Ceci a suggéré son importance dans le développement du système nerveux central des vertébrés, probablement au niveau du développement des interneurones, au vue de son pattern d'expression.

IV/ ARX et défauts neurologiques développementaux.

De nombreuses mutations du gène ARX ont été retrouvées dans des désordres neurologiques précoces. Au vue de son implication dans les pathologies neurologiques développementales et de son pattern d'expression au niveau du cerveau en développement, plusieurs équipes de recherche se sont intéressées au rôle du gène ARX au cours de développement cérébral.

A. Les mutations d'ARX : une hétérogénéité phénotypique chez l'Homme.

Les déficiences intellectuelles ont une importance médicale considérable puisqu'elles touchent près d'un individu sur 50 au sein de la population mondiale. Elles peuvent résulter de causes génétiques et/ou environnementales. Le fait que le retard mental touche préférentiellement les garçons a engendré des analyses plus précises des gènes localisés sur le chromosome X. Ainsi, un type de retard mental : le retard mental lié au chromosome X (ou XLMR) a été identifié. Il s'agit d'une pathologie commune, cliniquement et génétiquement complexe dont la prévalence est estimée à environ un cas pour 600 à 1000 individus (Gécz et al., 2009). Ces dernières années, des études ont identifié plus de 90 gènes différents sur le chromosome X impliqués dans les XLMR, tels que les gènes MECP2 (methyl CpG-binding protein 2) et CDKL5 (cyclin-dependent kinase-like 5) (Gécz et al., 2009). Un des gènes les plus fréquemment mutés dans les XLMR est le gène ARX.

Depuis sa découverte chez l'homme en 2002, de nombreuses mutations du gène ARX ont été répertoriées dans plus d'une dizaine de désordres neurologiques précoces différents où les retards mentaux sont associés ou non à des crises d'épilepsie. Ces pathologies engendrent ou non des malformations cérébrales pendant le développement embryonnaire et peuvent être classées en deux catégories : celles sans malformation cérébrale apparente et celles présentant des anomalies structurales du cerveau. (pour revue, voir (Shoubridge et al., 2010)).

1. Pathologies liées à ARX, sans malformation cérébrale apparente.

1.1 Retards mentaux non syndromiques.

Les retards mentaux non syndromiques (NS-XLMR, non-syndromic X-linked mental retardation) sont les formes les « moins sévères » des pathologies résultant de mutations du gène ARX. Les patients atteints de ce type de pathologies présentent des retards mentaux plus ou moins sévères sans aucune malformation cérébrale décelable. Les mutations dans ce type de pathologies ont été retrouvées au niveau des deux premiers domaines polyalanine de la protéine *ARX* (expansion polyalanine) mais aussi au niveau du domaine octapeptide (mutation faux-sens) (Bienvenu et al., 2002; Grønskov et al., 2004; Nawara et al., 2006; Poirier et al., 2006).

1.2 Retards mentaux syndromiques.

Il existe plusieurs types de retards mentaux syndromiques liés à des mutations du gène ARX dont voici les principales caractéristiques et leurs mutations associées :

- <u>Le syndrome de Partington</u> (PRT) est caractérisé par un retard mental associé à des mouvements dystoniques des mains et de l'ataxie.
 - Expansion du deuxième domaine polyalanine (Bienvenu et al., 2002; Nawara et al., 2006).
- <u>Des déficiences intellectuelles associées à des convulsions toniques et dystoniques</u> (MR/TS/Dys, Mental retardation with tonic seizures with dystonia).
 - Expansion du premier domaine polyalanine (Shinozaki et al., 2009).
- <u>Des retards mentaux associés à une épilepsie myoclonique avec spasticité</u> (XMESID, Xlinked myoclonic epilepsy with spasticity and intellectual disability).
 - Mutation faux-sens dans l'homéodomaine (Scheffer et al., 2002; Stromme et al., 2002).

- <u>Le syndrome de West</u> (ISSX, X-linked infantile spasms syndrome) est caractérisé par des spasmes infantiles, un retard mental et de l'hypsarythmie.
 - Expansion du premier domaine polyalanine (Guerrini et al., 2007; Stromme et al., 2002).
 - Expansion du deuxième domaine polyalanine (Kato et al., 2003; Stromme et al., 2002).
 - > Délétion dans le domaine Aristaless (Stromme et al., 2002).
 - Mutation faux-sens dans l'homéodomaine (Shoubridge et al., 2010).
- Des encéphalopathies épileptiques associées à des spasmes infantiles, des dystonies sévères généralisées et un retard mental profond (IEDE, idiopathic infantile epilepticdyskinetic encephalopathy).
 - ➢ Expansion du premier domaine polyalanine de la protéine (Guerrini et al., 2007).
- <u>Le syndrome d'Ohtahara</u> (OS) est une encéphalopathie associée à de fréquents spasmes toniques accompagnés d'un électroencéphalogramme typique montrant des traces de « suppression burst », un retard psychomoteur sévère et une faible espérance de vie.
 - Mutation non-sens au niveau du domaine octapeptide (Fullston et al., 2010).
 - > *Expansion du premier domaine polyalanine* (Absoud et al., 2010).
 - Mutation faux-sens du domaine Aristaless (Giordano et al., 2010).
 - Insertion au niveau du domaine Aristaless (Ekşioğlu et al., 2011).

2. Pathologies liées à ARX avec malformation cérébrale.

Il existe plusieurs types de pathologies liées à des mutations du gène ARX qui engendrent des malformations cérébrales. Voici leurs principales caractéristiques et leurs mutations associées :

- <u>Le syndrome de Proud</u> (ACC/AG) est caractérisé par un retard mental, une agénésie du corps calleux et une anormalité génitale.

Mutation faux-sens dans l'homéodomaine (Kato et al., 2004).

 <u>Des hydranencéphalies avec anormalité génitale</u> (HYD/AG). L'hydranencéphalie résulte en l'absence de développement des hémisphères cérébraux où l'espace intracrânien est remplacé par de l'eau (Figure 32).



Figure 32 : IRM d'un patient atteint d'hydranencéphalie avec anormalité génitale.

A-C. La plupart de l'espace intracrânien est occupé par de l'eau. Le corps calleux est absent comme la plupart du cerveau excepté le lobe frontal inférieur et le lobe temporal antérieur. Le cerveau résiduel présente peu de gyration avec un cortex de fin à normal. (D'après (Kato et al., 2004)).

Ce syndrome est associé à une anormalité du développement de l'appareil génital.

- Mutation non-sens dans l'homéodomaine (Kato et al., 2004).
- <u>Une agénésie du corps calleux associée à un retard mental, des spasmes infantiles, des crises toniques, de la dyskinésie, des contractures des membres et une scoliose.</u>
 - Mutation faux-sens dans l'homéodomaine (Conti et al., 2011).

Le syndrome XLAG, le plus sévère (X-linked lissencephaly with ambigious genitalia) est caractérisé par une microcéphalie, une lissencéphalie avec un gradient antéro-postérieur, une agénésie du corps calleux, un disfonctionnement de l'hypothalamus, une insuffisance pancréatique, une sévère hypotonie, une épilepsie néonatale et une anormalité de l'appareil génital (Figure 33). Les patients atteints de ce syndrome survivent de quelques semaines à quelques mois après la naissance.



Figure 33 : IRM d'un patient atteint du syndrome XLAG.

A-C. La lissencéphalie est caractérisée par une agyrie postérieure et une pachygyrie frontale. L'épaisseur du cortex est modérée. Le 3^{ème} ventricule est élargi et le corps calleux est absent. (D'après (Kato et al., 2004)).

- Plusieurs délétions (homéodomaine, 1^{er} domaine polyalanine, aboutissant à une troncation de la protéine) (Bhat et al., 2005; Kato et al., 2004).
- Des insertions au niveau de l'homéodomaine aboutissant à une troncation de la protéine (Kitamura et al., 2002; Okazaki et al., 2008)
- Des mutations faux-sens au niveau de l'homéodomaine et du domaine Aristaless (Kato et al., 2004; Kitamura et al., 2002; Uyanik et al., 2003).
- Des mutations non-sens dans l'exon 2 aboutissant à une troncation de la protéine (Kato et al., 2004).
- Des anomalies d'épissage avec des sauts d'exon aboutissant à la troncation de la protéine au niveau du domaine octapeptide et de l'homéodomaine (Kato et al., 2004).

Voici une figure récapitulative des différentes mutations du gène avec leurs pathologies associées :



Figure 34 : Les mutations d'ARX et leurs phénotypes associés.

Pour le syndrome XLAG, les mutations faux-sens sont en vert clair alors que les mutations qui mènent à une troncation de la protéine sont en vert foncé. Les mutations responsables du syndrome de Proud sont en orange, celles pour le syndrome de West (ISSX/WS) et de Partington (PRTS) sont en rose, celles pour les retards mentaux associés à une épilepsie myoclonique avec spasticité (XMESID) en noir et pour les retards mentaux non syndromiques (MRX) en bleu. (Tiré de (Friocourt et al., 2006)).

Il existe donc une forte hétérogénéité phénotypique liée aux mutations dans le gène *ARX*. Ce large spectre de phénotypes associés aux mutations du gène ARX reflète la complexité associée à la structure et à la fonction de la protéine.

Le nombre grandissant de mutations identifiées a permis de montrer deux choses importantes :

 - i) La protéine ARX semble être cruciale pour le développement du cerveau. Ce qui est supporté par le fait que les déficiences intellectuelles (de degré variable) sont toujours présentes chez les patients avec une mutation de ce gène.

- ii) L'hétérogénéité phénotypique peut, en partie, être expliquée par la nature et la localisation des mutations d'ARX. En effet, il est possible d'esquisser des corrélations génotype-phénotype. Ainsi, les phénotypes sans malformation sont principalement causés par des mutations qui se situent dans les domaines polyalanine et en dehors de l'homéodomaine. A l'inverse, les phénotypes plus sévères avec malformation cérébrale sont majoritairement associés à des mutations entrainant une troncation de la protéine ou se situant dans l'homéodomaine, domaine hautement conservé entre les espèces (Table 2).

	Phénotype	Type de mutation	Domaine protéique affecté	Références
Retard mental		Duplication	Expansion polyalanine (2 ^{ème} domaine PA)	(Bienvenu et al., 2002) (Nawara et al., 2006)
sans malformation	Retard mental lié à l'X non syndromique	Insertion	Expansion polyalanine (1 ^{er} domaine PA)	(Bienvenu et al., 2002)
cérébrale		Faux-sens	Octapeptide	(Bienvenu et al., 2002)
	Syndrome de Partington (PRT)	Duplication	Expansion polyalanine (2 ^{ème} domaine PA)	(Nawara et al., 2006) (Bienvenu et al., 2002)
	Retard mental avec convulsions toniques et dystonie (MR/TS/Dys)	Insertion	Expansion polyalanine (1 ^{er} domaine PA)	(Shinozaki et al., 2009)
	Epilepsie myoclonique liée à l'X avec déficience intellectuelle (XMESID)	Faux-sens	Homéodomaine	(Stromme et al., 2002) (Scheffer et al., 2002)
Retard mental + Epilepsie sans malformation cérébrale		Deletion	Aristaless	(Stromme et al., 2002)
	Conductor de Wast (ICCV)	Duplication	Expansion polyalanine (2 ^{ème} domaine PA)	(Kato et al., 2003) (Stromme et al., 2002)
	Synarome ae west (ISSX)	Insertion	Expansion polyalanine (1 ^{er} domaine PA)	(Stromme et al., 2002) (Guerrini et al., 2007)
		Faux-sens	Homéodomaine	(Shoubridge et al., 2010)
	Encéphalopathie épileptique/dyskinétique infantile (IEDE)	Insertion	Expansion polyalanine (1 ^{er} domaine PA)	(Guerrini et al., 2007)
		Non-sens	La protéine redémarre après le domaine octapeptide	(Fullston et al., 2010)
	Curdueste d'Obtehene (OC)	Duplication	Expansion polyalanine (1 ^{er} domaine PA)	(Absoud et al., 2010)
	Syndrome d Ontanara (OS)	Faux-sens	Aristaless	(Giordano et al., 2010)
		Insertion	Troncation de la protéine au niveau du domaine Aristaless	(Ekşioğlu et al., 2011)
	Syndrome de Proud (ACC/AG)	Faux-sens	Homéodomaine	(Kato et al., 2004)
	Hydranencéphalie avec anormalité génitale	Non-sens	Homéodomaine	(Kitamura et al., 2002) (Kato et al., 2004)
	Agénésie du corps calleux, retard mental, spasmes infantiles, crises toniques, dyskinésie, contracture des membres et scoliose	Faux-sens	Homéodomaine	(Conti et al., 2011)
Retard mental + Epilepsie +		Deletion	Homéodomaine, 1 ^{er} domaine PA, Troncation de la protéine	(Bhat et al., 2005) (Kato et al., 2004)
malformation cérébrale		Insertion	Homéodomaine, Troncation de la protéine	(Kitamura et al., 2002) (Okazaki et al., 2008)
	Syndrome XLAG	Faux-sens	Homéodomaine et Aristaless	(Uyanik et al., 2003) (Kato et al., 2004) (Kitamura et al., 2002)
		Non-sens	Exon 2, Troncation de la protéine	(Kato et al., 2004)
		Epissage	Saut d'exon, troncation de la protéine au niveau de l'homéodomaine et du domaine octapeptide	(Kato et al., 2004)

Table 2 : Les différentes mutations d'ARX et leurs phénotypes associés chez l'homme.

En rouge, noter que les expansions polyalanine dans le 1^{er} domaine sont retrouvées dans les phénotypes sans malformation cérébrale, de même que les expansions dans le 2^{ème} domaine polyalanine (PA) (en bleu). En vert, noter que les mutations dans l'homéodomaine se retrouvent le plus souvent dans les phénotypes les plus graves.

La compréhension du rôle du gène ARX lors de la mise en place du système nerveux central, ainsi que l'étude des conséquences de ses mutations sur le développement cérébral sont donc essentielles pour expliquer et prévenir de telles pathologies.

B. Rôles d'ARX dans le cerveau en développement chez les vertébrés.

1. ARX : un facteur de transcription bidirectionnel.

Des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que le gène Arx est à la fois un régulateur positif et négatif de la transcription de gènes importants pour le développement cérébral (Collombat et al., 2003; Fullenkamp and El-Hodiri, 2008; Fulp et al., 2008; McKenzie et al., 2007; Seufert et al., 2005). En effet, plusieurs domaines de la protéine ont été identifiés comme nécessaires à l'activité de répression tels que le domaine octapeptide et le domaine en C-terminal comprenant le 4^{ème} domaine polyalanine (Fullenkamp and El-Hodiri, 2008; McKenzie et al., 2007). Le domaine *aristaless* quant à lui a été identifié comme domaine impliqué dans l'activation de la transcription (McKenzie et al., 2007). Ce double rôle du gène Arx dans la régulation de la transcription a été confirmé par des études sur différents modèles animaux :

- Chez le Xénope, la surexpression du gène xArx dans le cerveau en développement entraine à la fois une diminution de l'expression de certains marqueurs cérébraux tels que *Nkx2.1* mais également l'augmentation d'autres marqueurs tels que *wnt8b* (Seufert et al., 2005).

- Chez les souris knock-out pour le gène Arx (E14.5), des expériences de microarray et d'hybridation *in situ* ont montré que l'absence du gène Arx entraîne une modification de l'expression de nombreux gènes dans le subpallium. Ainsi, lorsque le gène est absent, 57 gènes sont exprimés de façon plus importante alors que 27 gènes sont diminués (Fulp et al., 2008). Ces gènes modulés par le gène Arx sont impliqués dans des processus divers incluant : la migration neuronale, la neurogenèse et l'axonogenèse, la différentiation neuronale et la régulation de la transcription (Fulp et al., 2008).

- *Colasante et al.*, en 2009, ont montré que l'expression de plusieurs gènes est modifiée de façon positive ou négative en l'absence d'Arx chez des souris knock-out, dans les éminences ganglionnaires à E14.5 (Colasante et al., 2009).

Plus récemment, l'équipe du *Dr Friocourt*, en 2011, a montré par des expériences de chromatine immunoprécipitation (ChIP-chip) que 1006 gènes sont capables de se lier au gène ARX. Certains de ces gènes semblent être réprimés ou activés par l'intermédiaire de ce gène. (Quillé et al., 2011).

L'ensemble de ces données montrent que le gène Arx peut à la fois être activateur et répresseur de la transcription de gènes nécessaires au développement cérébral. Des changements de son activité trancriptionnelle, pouvant survenir suite à des mutations, pourraient avoir ainsi des impacts majeurs dans la régulation du développement du cerveau. De tels changements pourraient donc en partie expliquer la grande variété phénotypique retrouvée chez des patients ayant une mutation du gène ARX.

2. ARX et régionalisation du cerveau.

Le pattern d'expression de la protéine *Arx* a suggéré un rôle de ce gène dans la régionalisation du cerveau. En effet, l'expression d'*Arx* à E13.5 chez la souris présente un gradient antéropostérieur au niveau de la préplaque corticale correspondant au gradient des neurones migrant depuis les éminences ganglionnaires vers le cortex (Poirier et al., 2004). De plus, *Colombo et al.*, en 2004, ont montré que l'expression d'*Arx* suit un gradient rostro-caudal et ventro-dorsal dans le pallium en développement (Colombo et al., 2004). Ceci est en accord avec la sévérité des malformations corticales retrouvées chez les patients XLAG puisque la lissencéphalie est caractérisée par une pachygyrie antérieure et une complète agyrie postérieure (Bonneau et al., 2002).

Depuis, des études ont renforcé l'idée qu'Arx pouvait être impliqué dans la régionalisation cérébrale. En effet, l'étude de souris knock-out pour le gène Arx a révélé des défauts du striatum dorsal (taille réduite) alors que le striatum ventral est complètement absent (Colombo et al., 2007). Ceci suggère qu'Arx aurait un rôle plus important dans le striatum ventral.

Les études les plus significatives ont été réalisées chez le *Xénope*. Il a été montré que des défauts d'expression du gène xArx2 entrainent des défauts de développement de la crête neurale antérieure nécessaire à l'organisation du cerveau, ce qui suggère que l'activité de xArx2 est nécessaire pour cette fonction (Wolanski et al., 2009). De plus, le gène Arx limite l'expression antérieure des gènes Irx nécessaires au développement antéro-postérieur du cerveau du *Xénope* (Rodriguez-Seguel et al., 2009).

L'ensemble de ces données montrent que le gène Arx a un rôle essentiel dans la spécification et le développement du cerveau.
3. Rôle sur les cellules pyramidales

Bien que majoritairement exprimé dans les interneurones, Arx influence également le développement des cellules pyramidales corticales. Ceci est suggéré par plusieurs observations :

i) *Arx* est exprimé au niveau de la zone ventriculaire corticale, zone progénitrice des cellules pyramidales (Kitamura et al., 2002; Poirier et al., 2004).

ii) L'analyse histologique du cortex de patients atteints du syndrome XLAG a révélé une mauvaise organisation des couches corticales où seulement trois couches sont distinguables au lieu de six normalement (Figure 35) (Bonneau et al., 2002; Marcorelles et al., 2010; Okazaki et al., 2008; Saito et al., 2011).





A. Coupe coronale du cerveau présentant une lissencéphalie avec une dilatation marquée des ventricules et une proportion faible de matière blanche. **B**. Le cortex est composé de seulement 3 couches. (D'après (Okazaki et al., 2008)).

iii) Les souris knock-out pour le gène Arx ont un cortex d'épaisseur réduite présentant une organisation laminaire simplifiée en trois couches au lieu de six (Kitamura et al., 2002).

iv) Des souris knock-in pour la mutation P353R du gène ARX (mutation retrouvée dans les patients atteints du syndrome XLAG) présentent également des anomalies de lamination corticale (Kitamura et al., 2009).

Il a ainsi été suggéré que les altérations du gène Arx pouvaient avoir des conséquences sur la prolifération, la migration et la morphologie des cellules pyramidales.

En 2002, *Kitamura et al.* ont montré, par des injections de BrdU, que l'absence du gène Arx chez les souris knock-out, entraine une diminution de la prolifération dans la zone ventriculaire corticale et que cette diminution n'est pas liée à une mort cellulaire (Kitamura et al., 2002).

Les travaux sur l'étude du rôle d'Arx dans les cellules pyramidales les plus intéressants ont été réalisés par *Friocourt et al.* en 2008. En effet, cette équipe a montré que l'inactivation du gène Arx dans la zone ventriculaire corticale après électroporation *in utero* entraine une sortie prématurée du cycle cellulaire des progéniteurs des cellules pyramidales. A l'opposé, la surexpression du gène aboutit à une augmentation de la durée du cycle. De plus, par cette même technique, cette équipe a montré que l'inactivation et la surexpression du gène Arx entraine des altérations de la migration radiaire qui sembleraient plutôt être caractérisés par un retard de migration plutôt qu'à un arrêt de migration. La morphologie des cellules électroporées est également modifiée : l'inactivation entraine un diminution du nombre de prolongements des cellules de la zone sous ventriculaire et intermédiaire, alors que la surexpression mène à un branchement complexe et une orientation tangentielle de certaines cellules (Friocourt et al., 2008).

4. Rôle sur les interneurones

Le plus grand nombre d'études sur le rôle d'Arx au cours du développement cérébral a été réalisé au niveau des interneurones, et ceci à cause des faits suivants :

i) Arx est majoritairement exprimé dans les interneurones en développement (Colombo et al., 2004; Kitamura et al., 2002; Poirier et al., 2004). En effet, la plupart des cellules positives pour la protéine *Arx* sont également positives pour le marqueur GABA. Cependant, toutes les cellules GABA positives n'expriment pas forcément la protéine *Arx* (Friocourt et al., 2008).

ii) On retrouve, chez les patients XLAG, une très faible proportion de neurones GABAergiques et ceux ci sont anormalement distribués dans le cortex. Ils sont retrouvés confinés dans la couche II corticale au lieu d'être répartis de façon homogène entre les couches II-V (Bonneau et al., 2002; Marcorelles et al., 2010; Okazaki et al., 2008).

iii) Les souris knock-out pour le gène Arx présentent une perte majeure d'interneurones dans le cortex et le striatum (Colombo et al., 2007; Kitamura et al., 2002). De plus, les interneurones restant sont anormalement distribués dans les couches corticales (Kitamura et al., 2002).

Ainsi, de nombreux travaux ont été réalisés afin de clarifier l'origine de cette perte d'interneurones. Il a ainsi été proposé que les altérations d'Arx puissent engendrer des défauts de prolifération, de migration et/ou de différenciation des interneurones.

4.1 Prolifération

L'étude de souris knock-out pour le gène Arx a montré que la zone sous ventriculaire des éminences ganglionnaires latérales est beaucoup plus large que chez des souris sauvages (Colombo et al., 2007). Ceci suggère qu'il y a une accumulation de cellules dans cette zone qui pourrait être liée à un défaut de prolifération. De plus, *Yoshihara et al.* ont montré, par des injections de BrdU à E14.5 chez les souris knock-out, que la prolifération des interneurones du bulbe olfactif est diminuée en l'absence d'Arx (Yoshihara et al., 2005).

En 2008, *Friocourt et al.* ont montré que la surexpression et l'inactivation du gène Arx par électroporation sur tranche organotypique dans les éminences ganglionnaires de souris à E14.5 entraine une accumulation de cellules dans la zone ventriculaire des éminences ganglionnaires (Friocourt et al., 2008). Pour voir si cette accumulation résultait d'un défaut de prolifération, cette équipe a réalisé une immunohistochimie avec un marqueur Ki67 (marqueur de la prolifération cellulaire). Ils n'ont cependant pas observé de différence avec une condition contrôle. L'ensemble des ces travaux suggèrent ainsi un rôle du gène ARX dans la prolifération des progéniteurs des éminences ganglionnaires. Des études futures seront cependant nécessaires pour clarifier cet aspect.

4.2. Migration

Les premiers travaux suggérant l'implication d'Arx dans la migration des interneurones ont été réalisés chez le premier modèle de souris déficientes pour le gène Arx généré par l'équipe du *Dr. Kitamura* (Kitamura et al., 2002). Cette équipe a montré que chez les souris déficientes pour le gène Arx (KO), l'expression de différents marqueurs des éminences ganglionnaires tels que *Dlx1* est perturbée à E14.5. En effet, *Dlx1* est retrouvée normalement dans les zones marginale, intermédiaire et sous ventriculaire corticales chez des souris KO (**Figure 36 A-B**) (Kitamura et al., 2002). De plus, des cristaux de DiI ont été déposés sur les éminences ganglionnaires de coupes de cerveaux WT ou KO à E13.5 maintenues en culture pendant 2 jours afin de marquer les interneurones en migration. Une perte de la migration depuis les éminences ganglionnaires vers la zone intermédiaire corticale était observée sélectivement chez les mutants (**Figure 36 C-E**) (Kitamura et al., 2002). Ceci suggère ainsi que l'absence d'Arx entraine une perte de la voie de migration vers la zone intermédiaire mais pas celle vers la zone sous ventriculaire et al., 2002).



Figure 36 : Perte de la voie de migration des interneurones vers la zone intermédiaire chez les souris déficientes pour le gène Arx.

A-B. *Dlx1* n'est pas exprimé dans la zone marginale et intermédiaire du cortex chez les souris KO (flèches blanches en **B**, comparé à l'expression positive dans le cortex de souris WT, flèches noires en **A**), mais est exprimé dans la zone sous ventriculaire corticale chez les mutants (flèche noires en **B**). **C-E**. Des cristaux de Dil ont été placés dans les éminences ganglionnaires médianes à E13.5 et cultivés pendant 2 jours. Les encarts montrent les coupes de cerveaux en lumière visuelle avant la culture, les flèches indiquent la position des cristaux de Dil. Les cellules positives pour le Dil sont entrées dans la zone intermédiaire et sous ventriculaire (en **C**) du cortex des souris WT, alors que les cellules positives pour le Dil (flèches blanches en **E**) sont entrées seulement dans la zone sous ventriculaire corticale chez les souris KO (en **D**). Barres d'échelle : **C-D** (200µm), **E** (100µm). (D'après(Kitamura et al., 2002)).

Les plus importants travaux montrant l'implication d'Arx dans la migration des interneurones ont été réalisés par l'équipe de *Colombo et al.*, en 2007, en faisant des transplantations homotypiques et des expériences de migration sur Matrigel (Colombo et al., 2007). La zone des éminences ganglionnaires latérales (LGE) issue de souris WT (GFP+) a été greffée sur des tranches de cerveau issues de souris knock-out (KO) pour le gène Arx. Après 48h, les cellules WT GFP+ sont sorties de la zone des éminences ganglionnaires et ont migré sur la tranche KO. A l'inverse, lorsque les éminences ganglionnaires issues de souris KO sont greffées sur des tranches de cerveau de souris WT, les cellules mutantes n'ont pas été capables de migrer (**Figure 37 A-F**). De plus, des cultures d'explants d'éminences ganglionnaires sur Matrigel ont été réalisées. 48h plus tard, les cellules issues des

explants de souris WT ont migré sur la matrice et loin de l'explant alors que celles issues des explants de souris KO présentent une migration très réduite (**Figure 37 G-H**).



Figure 37 : Défaut de migration des interneurones chez les souris déficientes pour le gène Arx.

A-C. Transplantation d'explants de LGE issus de souris WT (GFP+) dans leur site homotypique d'une coupe de cerveau issue de souris knock-out pour le gène Arx cultivée *in vitro*. **A**. Vue en lumière visuelle de la coupe de cerveau transplantée après 24h. **B**. Analyse de la migration des cellules WT (GFP+). Les flèches indiquent les cellules ayant migré loin de la zone de greffe. Les pointillés indiquent la zone de greffe. **C**. zoom de la zone encadrée en **B**. **D-F**. Transplantation d'explants de LGE issus de souris knock-out pour le gène Arx (LacZ+) dans leur site homotypique d'une coupe de cerveau issue de souris WT cultivée *in vitro*. **D**. Site de la greffe dans la zone striatale périventriculaire. Les flèches indiquent le tissu greffé. **E**. Identification des neurones mutants greffés par un marquage X-Gal après 48h de culture *in vitro*. **F**. Zoom de la zone encadrée en **E**. **G-H**. Expérience de migration *robuste vers l'extérieur de l'explant de MGE*. **H**. Les neurones déficients pour le gène Arx n'ont pas migré à l'extérieur de l'explant de MGE et restent localisés près de l'explant 48h après. Barres d'échelle A-H : 200µm. (D'après (Colombo et al., 2007)).

Ces données suggèrent que des défauts cellulaires intrinsèques, liés à l'absence du gène Arx, pourraient expliquer une altération de la migration des interneurones (Colombo et al., 2007) et ont été confortées par d'autres équipes. En effet, l'inactivation et la surexpression d'Arx par électroporation sur tranche organotypique dans les éminences ganglionnaires de souris à E14.5, ont révélé que des défauts d'expression d'Arx (que ce soit l'inactivation ou la surexpression) aboutissent à des défauts de migration tangentielle des interneurones (Friocourt et al., 2008). De plus, Colasante et al., en 2008, ont montré que le gène Arx est une cible des gènes Dlx2, nécessaires à la migration des interneurones. Ainsi, Arx contribuerait via la voie de signalisation Dlx2 à la migration tangentielle des interneurones (Colasante et al., 2008). En 2009, l'équipe de Kitamura et al. a généré trois lignées de souris knock-in pour les mutations d'Arx suivantes P353R, P353L et (GCG)7, qui sont retrouvées respectivement dans les pathologies suivantes : le syndrome XLAG, les épilepsies myocloniques avec spasticité et retard mental et le syndrome de West. Pour évaluer la migration des cellules GABAergiques, ces auteurs ont croisé les souris knock-in avec des souris glutamate décarboxylase (GAD67-GFP) hétérozygotes, permettant la visualisation des interneurones en migration en période embryonnaire par la fluorescence GFP. De facon intéressante, cette équipe a montré que la mutation P353R engendre des défauts sévères de migration tangentielle des interneurones soulignant ainsi l'importance d'Arx dans la migration tangentielle (Kitamura et al., 2009). Cependant, les mutations P353L et (GCG)7 entrainent seulement des défauts mineurs et transitoires de cette voie de migration (Kitamura et al., 2009).

De plus, l'analyse histologique de coupes de cerveau de patients atteints du syndrome XLAG a révélé une augmentation d'environ dix fois supérieure du nombre de cellules GABAergiques (GAD67+) dans la zone sous ventriculaire corticale comparé à des cerveaux de patients sains (Okazaki et al., 2008). Ces cellules expriment les marqueurs Nestin et Mash1 ce qui suggère un arrêt de la maturation neuronale et probablement une altération du changement de mode de migration tangentielle versus radiaire qui est normalement nécessaire à la mise en place finale des interneurones au sein de la plaque corticale (Marcorelles et al., 2010; Okazaki et al., 2008).

Enfin, Arx semble également important pour la mise en place des interneurones du bulbe olfactif. En effet, *Yoshihara et al.*, en 2005, ont montré que chez les souris déficientes pour le gène Arx, la taille des bulbes olfactifs est réduite et la voie de migration rostrale (RMS) est diminuée de façon rostrocaudale mais beaucoup plus épaisse que chez les souris sauvages. Il

semblerait que l'absence d'Arx affecterait l'entrée des progéniteurs des interneurones dans le bulbe olfactif plutôt que le processus de migration via la RMS (Yoshihara et al., 2005).

4.3. Morphologie et différenciation

Il semblerait que le gène Arx soit impliqué dans la morphologie des interneurones. En effet, les expériences sur Matrigel (décrites plus haut) par l'équipe de *Colombo et al.*, ont révélé que les neurones issus des éminences ganglionnaires de souris KO cultivés sur matrigel présentent des anomalies morphologiques (Colombo et al., 2007). En effet, les cônes de croissance des neurones mutants présentent une augmentation de la longueur et du nombre de points de branchement, comparés aux neurones WT (Colombo et al., 2007). Cependant, *Friocourt et al.*, en 2008, ont montré que l'inactivation d'ARX dans les progéniteurs des interneurones sur des tranches organotypiques par électroporation n'entraine pas de modification de la morphologie des interneurones, alors que la surexpression d'Arx, par cette même technique, modifie la morphologie des interneurones qui ont une allure bipolaire avec un très long cône de croissance (Friocourt et al., 2008).

Pour évaluer si Arx est nécessaire à la spécification GABAergique, des cultures à E16 de cortex et d'éminences ganglionnaires ont été réalisées et transfectées afin de surexprimer ou d'inactiver Arx (Friocourt et al., 2008). De façon intéressante, des immunomarquages réalisés avec les marqueurs GABA et calbindine n'ont pas révélé de différences d'expression de ces marqueurs, que ce soit en inactivant ou en surexprimant le gène Arx (Friocourt et al., 2008). Ceci suggère donc que le gène Arx n'est ni nécessaire, ni suffisant à la spécification GABAergique.

Pourtant un certain nombre d'études suggère qu'Arx aurait un rôle possible dans différents sous types d'interneurones puisque certain de ces sous types semblent perturbés suite à des altérations d'Arx. Il semblerait en effet que le gène Arx ait un rôle prépondérant principalement pour les interneurones NPY, calbindine et cholinergiques. Les principales modifications sont répertoriées dans le tableau suivant :

Modèle d'altération d'Arx	Expression d'Arx	Stade de développement	Modification du sous type d'interneurones	Structure	Références
Souris knock-out (1er modèle par insertion du gène Lac Z)	Absence du gène	E16.5	Absence d'interneurones calbindine dans la plaque corticale, mais 🛪 dans la zone intermédiaire	Cortex	Cortex (Kitamura et al., 2002) ortex et pocampe
		E18.5	Absence d'interneurones NPY	Cortex et Hippocampe	
		E16.5 et P0	Absence de cellules périglomérulaires (TH+)	Bulbe olfactif	(Yoshihara et al., 2005)
Souris knock-out (2ème modèle par insertion du gène Lac Z)	Absence du gène	PO	ades interneurones calbindine	Cortex et Striatum Striatum	(Colombo et al., 2007)
			ades interneurones calretinine		
			Absence d'interneurones NPY		
			Absence d'interneurones ChAT		
Souris knock out conditionnelles (ARX floxé, croisement avec des souris Pou3f4/Cre+)	Absence du gène	E18.5	des interneurones calbindine (distribution anormale)	Cortex	(Fulp et al., 2008)
Souris knock out conditionnelles (Arx floxé, croisement avec souris DIx5-6/Cre+)	Absence du gène uniquement dans les neurones dérivant des éminences ganglionnaires	Souris adulte	A des interneurones calbindine	Cortex	(Marsh et al., 2009)
			ades interneurones calretinine		
Patient XLAG	ARX muté (insertion, 1013A>CC)	11 mois	a des interneurones calretinine	Cortex	(Okazaki et al., 2008)
			💙 des interneurones CCK		
Patient XLAG	ARX muté (mutation faux sens 232G>T)	35 semaines	Ades interneurones calretinine	Cortex et LGE LGE et SVZ Cortex et LGE	(Marcorelles et al., 2010)
			Absence d'interneurones parvalbumine		
			des interneurones calbindine		
Souris knock-in P353R	ARX muté (mutation faux sens 353P>R)	РО	a des interneurones SST	Striatum	(Kitamura et al., 2009)
			Absence d'interneurones cholinergiques (Lhx8+)		
Souris knock-in P353L	ARX muté (mutation faux sens 353P>L)	1 mois	🔰 des interneurones NPY	- - Striatum	(Kitamura et al., 2009)
			▲ des interneurones NOS		
			Sector faible des interneurones parvalbumine		
			A des interneurones SST		
			💙 des interneurones ChAT		
Souris knock-in (GCG)7	ARX muté (expansion polyalanine + 7 GCG dans le premier domaine polyalanine)	1 mois	a des interneurones NPY	Striatum	(Kitamura et al., 2009)
			▲ des interneurones NOS		
			a faible des interneurones parvalbumine		
			► des interneurones SST		
			Absence d'interneurones ChAT		
Souris knock-in ^{(GCG)10+7}	ARX muté (expansion polyalanine + 7 GCG dans le premier domaine polyalanine)	Souris adulte	A des interneurones calbindine	Cortex et Striatum Striatum	- (Price et al., 2009)
			🔰 des interneurones NPY		
			🕒 des interneurones ChAT		

<u>Table 3 : Variation des différents sous types d'interneurones en fonction des modèles d'altération</u> <u>du gène Arx.</u>

Les interneurones calbindine sont représentés en rouge, les cholinergiques en vert et les NPY en marron. ChAT : Choline acétyltransférase, NPY : Neuropeptide Y, CCK : Cholecystokinine, SST : somatostatine, NOS : Nitric oxyde synthase, LGE : éminence ganglionnaire latérale, SVZ : Zone sous ventriculaire.

5. Rôle sur la balance excitation/inhibition

Les patients portant une mutation du gène présentent des crises d'épilepsie sévères et ces crises sont également retrouvées chez des souris transgéniques chez lesquelles le gène Arx est altéré.

En effet, un grand nombre de pathologies liées à des mutations d'ARX chez l'Homme présentent des crises d'épilepsie. Ces pathologies incluent : les XMESID (Scheffer et al., 2002), le syndrome de West (Kato et al., 2003), le syndrome d'Ohtahara (Fullston et al., 2010), et le syndrome XLAG (Spinosa et al., 2006).

De plus, les souris chez lesquelles le gène Arx est inactivé spécifiquement dans les interneurones présentent une variété de types de crises épileptiformes incluant celles mimant les spasmes infantiles, qui commencent à des stades précoces et continuent au cours du développement (Marsh et al., 2009). L'équipe de *Kitamura et al.*, en 2009, a montré que des souris transgéniques knock-in pour la mutation P353L (retrouvée dans les cas d'épilepsies myocloniques avec spasticité et retard mental) et (GCG)7 (retrouvée dans le syndrome de West) présentent également des épisodes épileptiformes (Kitamura et al., 2009). Cette même année, un autre modèle de souris knock-in pour la mutation (GCG)7 a aboutit à la même conclusion (Price et al., 2009).

La distribution aberrante et la perte d'interneurones pourrait modifier la formation du circuit neuronal inhibiteur, engendrant des défauts de balance excitation/inhibition pouvant conduire à l'épilepsie. C'est pourquoi, *Kato et Dobyns* ont proposé le terme d'interneuronopathies développementales pour décrire les pathologies liées à des mutations d'ARX, notamment le syndrome XLAG et de West (Kato and Dobyns, 2005). Cependant, à ce jour, aucune étude n'a été réalisée afin de comprendre l'origine des épilepsies liées à des mutations du gène ARX.

6. Schéma récapitulatif



Figure 38 : Schéma récapitulatif des principaux rôles d'Arx suggérés dans le développement cérébral.

A-B. De part son pattern d'expression, Arx semble être impliqué dans la régionalisation. *Arx* est exprimé selon un gradient antéro-postérieur (**A**) et dorso-ventral (**B**). **C**. Schéma d'une coupe coronale de cerveau de souris en développement. <u>Pattern d'expression d'Arx en rose pâle</u> : *Arx* est exprimé dans la zone sous ventriculaire du cortex, dans la zone non proliférative des éminences ganglionnaires et dans les interneurones en migration (flèches rose). <u>En bleu</u> : rôle suggéré d'Arx dans les cellules pyramidales. <u>En vert</u> : rôle suggéré d'Arx dans les interneurones.

C. Les mutations d'ARX : (GCG)7, P353L, P353R et dup24.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à quatre mutations retrouvées dans le gène ARX, mutations que nous avons pu obtenir par l'intermédiaire de collaborations. Il s'agit des mutations (GCG)7, P353L, P353R et dup24 dont voici les principales caractéristiques et études.

1. La mutation (GCG)7.

Un grand nombre de pathologies humaines sont liées à des expansions (répétitions d'un seul acide aminé) dans un domaine protéique donné. Les expansions polyglutamine, les plus étudiées, ont été identifiées chez l'Homme dans plusieurs modèles de pathologies neurodégénératives incluant la chorée de Huntington (pour revue voir (Cummings and Zoghbi, 2000; Zoghbi and Orr, 2000)). Ces dernières années, un autre type d'expansions, les expansions polyalanine ont également été décrites dans plusieurs pathologies humaines. Ainsi, des expansions dans les domaines polyalanine de neuf gènes différents ont été caractérisées. Huit d'entres eux sont des facteurs de transcription (FOXL2, ZIC2, PHOX2B, ARX, SOX3, RUNX2, HOXA13, HOXD13) et un seul code pour une protéine de liaison nucléaire polyadenine (PABPN1) (pour revue voir (Albrecht and Mundlos, 2005; Brown and Brown, 2004).

Plusieurs expansions polyalanine du gène ARX ont été identifiées (Cossee et al., 2011; Stromme et al., 2002), et ces expansions représentent la plus grande partie des mutations retrouvées dans le gène. La mutation (GCG)7 est une expansion de sept triplets de nucléotides GCG répétés en tandem dans le premier domaine polyalanine du gène ARX. Elle est la $2^{\text{ème}}$ mutation la plus fréquente retrouvée dans le gène (Shoubridge et al., 2010). La conséquence d'une telle mutation sur la fonction de la protéine est à ce jour encore inconnue bien qu'une perte partielle de fonction ait été suggérée (Friocourt and Parnavelas, 2010; Friocourt et al., 2006; Nasrallah et al., 2004; Shoubridge et al., 2007).

1.1 Phénotype chez l'homme.

Chez l'Homme, cette mutation est retrouvée de façon sporadique ou familiale dans plusieurs pathologies liant retard mental et épilepsie telles que : des déficiences intellectuelles associées à des convulsions toniques et dystoniques (Shinozaki et al., 2009), des encéphalopathies épileptiques/dyskinétiques infantiles (Guerrini et al., 2007), et les syndromes d'Ohtahara (Absoud et al., 2010) et de West (Guerrini et al., 2007; Stromme et al., 2002). De façon intéressante, aucune des pathologies engendrées par cette mutation n'entraine des malformations cérébrales majeures, et l'origine des épilepsies chez ces patients est encore inconnue.

1.2. Les études in vitro et in vivo.

Il a été proposé que ce type de mutations (expansions polyalanine) peut causer des agrégations de la protéine (pour revue voir (Albrecht and Mundlos, 2005)). Des études *in vitro* ont montré que des transfections cellulaires du gène ARX avec la mutation (GCG)7 entrainent des inclusions intranucléaires et des agrégations cytoplasmiques de la protéine ainsi qu'une augmentation de la mort cellulaire (Friocourt et al., 2006; Nasrallah et al., 2004; Shoubridge et al., 2007). Deux études réalisées sur des souris knock-in pour la même mutation ont montré l'absence d'inclusions nucléaires *in vivo* (Kitamura et al., 2009; Price et al., 2009). Cependant, l'équipe de *Price et al.* a montré que 45% des cellules exprimant *Arx* dans leur modèle de souris knock-in présentent une localisation cytoplasmiques de la protéine comparé à 25% chez des souris sauvages (Price et al., 2009), ce qui suggère que le phénotype pourrait être lié au moins en partie à une localisation subcellulaire anormale de la protéine.

L'analyse du phénotype des deux modèles de souris knock-in pour la mutation (GCG)7 a révélé plusieurs points importants :

- Comme chez l'homme, ces souris ne présentent pas d'anomalie grossière des structures du cerveau mais montrent des électroencéphalogrammes anormaux accompagnés d'événements myocloniques sévères équivalent à des spasmes infantiles, ainsi que des défauts cognitifs et de comportements (Kitamura et al., 2009; Price et al., 2009).

- Ces deux équipes ont montré que leurs modèles présentent une perte de neurones GABAergiques et cholinergiques importantes dans le striatum.

- Au niveau du cortex, l'équipe de *Price et al.* a reporté une diminution des interneurones calbindine (Price et al., 2009), alors que l'équipe de *Kitamura et al.* a plutôt reporté une

diminution des interneurones parvalbumine (Kitamura et al., 2009). Cependant, cette réduction des interneurones dans le cortex reste très modérée.

Bien qu'il ait été proposé que cette perte modérée d'interneurones corticaux soit la conséquence d'un défaut de migration des interneurones, et que ceci serait la cause des épilepsies observées, aucune étude n'a été réalisée à ce jour pour clarifier l'origine de ces épilepsies chez ces modèles animaux.

2. La mutation P353L

La mutation d'ARX P353L est une mutation faux-sens au niveau de l'homéodomaine de la protéine (une proline est remplacée par une leucine en position 353 de la protéine). Il semblerait que cette mutation entraine une diminution modérée de l'activité transcriptionnelle de répression de la protéine (Friocourt and Parnavelas, 2010).

Chez l'Homme, cette mutation est retrouvée dans des retards mentaux associés à une épilepsie myoclonique avec spasticité (XMESID) sans malformation cérébrale apparente (Scheffer et al., 2002; Stromme et al., 2002).

L'analyse *in vitro* de la transfection de cette forme mutée sur une lignée de cellules HEK n'a pas révélée de localisation subcellulaire anormale de la protéine (Shoubridge et al., 2010).

En 2009, une souris knock-in pour la mutation P353L a été générée (Kitamura et al., 2009). Les souris mâles portant cette mutation vivent jusqu'à plus de six mois et présentent des crises d'épilepsie modérées et un faible défaut d'apprentissage. Chez ces souris, la migration des neurones GABAergiques dans le cortex ne semble pas être perturbée alors qu'il y a un défaut de migration de ces cellules dans le striatum. Une perte modérée de neurones GABAergiques et cholinergiques dans le striatum est également rapportée (Kitamura et al., 2009).

3. La mutation P353R

La mutation d'ARX P353R, comme la P353L, est une autre mutation faux-sens au niveau de l'homéodomaine (une proline est remplacée non pas par une leucine comme pour la mutation P353L mais par une arginine en position 353 de la protéine). Il semblerait que cette mutation entraine une perte drastique de l'activité transcriptionnelle de répression de la protéine (Friocourt and Parnavelas, 2010).

Chez l'Homme, cette mutation est retrouvée dans les lissencéphalies liées au chromosome X avec anomalies génitales (Syndrome XLAG), pathologie la plus sévères due à une mutation d'ARX, liant à la fois retard mental, épilepsie et malformation cérébrale (Kato et al., 2004). En 2009, l'équipe de *Kitamura et al.* a généré un modèle de souris knock-in pour la mutation P353R (Kitamura et al., 2009). Les souris mâles portant la mutation meurent très rapidement après la naissance et présentent une forte diminution du niveau du transcrit et de la protéine *Arx*. De plus, l'analyse histologique a mis en évidence une diminution sévère des neurones GABAergiques et cholinergiques au cours du développement cérébral ainsi qu'une lamination corticale anormale. Le phénotype de ces souris est ainsi très similaire au souris déficientes pour le gène Arx (Colombo et al., 2007; Kitamura et al., 2002), et récapitulent les principales caractéristiques cliniques des patients atteints du syndrome XLAG.

4. La mutation Dup24

La plus fréquente mutation retrouvée dans le gène ARX est la mutation c.428_451dup24 (environ 45% des mutations d'ARX). Il s'agit d'une duplication de 24 paires de bases dans l'exon 2 du gène aboutissant à une expansion du 2^{ème} domaine polyalanine de la protéine. Chez l'Homme, elle est retrouvée dans plusieurs pathologies différentes telles que : le syndrome de Partington (Bienvenu et al., 2002; Poirier et al., 2006) et de West (Kato et al., 2003; Stromme et al., 2002) mais aussi dans des cas de retards mentaux non syndromiques (Bienvenu et al., 2005). A ce jour, les conséquences d'une telle mutation sur le développement cérébral n'ont été que peu étudiées.

Ainsi, des mutations dans un même gène ARX engendrent des phénotypes différents dont la sévérité est variable. De façon intéressante, une mutation faux-sens à la même position dans l'homéodomaine engendre un phénotype avec (P353R) ou sans malformation cérébrale (P353L). Cette hétérogénéité phénotypique liée à ces mutations d'ARX reflète la complexité des liens génotype-phénotype liés à des mutations d'ARX et rend très intéressante l'étude des conséquences de ces mutations dans le développement cérébral.

RESULTATS

I/ Article: "An epilepsy-related ARX polyalanine expansion modifies glutamatergic neurons excitability and morphology without affecting GABAergic neurons development".

<u>Résumé</u>

Comme évoqué dans l'introduction de ce manuscrit, des anomalies de la migration neuronale peuvent engendrer de sévères malformations corticales souvent associées à des épilepsies. Parmi ces pathologies, les encéphalopathies épileptiques forment un groupe hétérogène de désordres neurologiques infantiles sévères. Les analyses génotype-phénotype n'en ont, à ce jour, pas encore bien clarifié les bases physiopathologiques. Des altérations des neurones GABAergiques ont été trouvées dans certains de ces syndromes, notamment chez les patients atteints du syndrome XLAG, pathologie engendrée par des mutations du gène ARX (aristaless related homeobox gene). Comme évoqué précédemment, ce gène code pour un facteur de transcription et son expression est retrouvée majoritairement dans les interneurones. Des études ont montré que des altérations du gène ARX entrainent une perte d'interneurones et que cette perte résulterait d'un défaut de migration de ces derniers au cours du développement cérébral. Ainsi, il a été suggéré que les épilepsies liées à des mutations du gène ARX résulteraient d'un défaut de la balance inhibitrice GABAergique du réseau neuronal et la notion d'interneuronopathies a été utilisée pour décrire les pathologies liées à ARX. Nous avons étudié ici l'impact d'une expansion polyalanine du gène ARX (ajout de sept triplets de nucléotides dans le premier domaine polyalanine, ou (GCG)7 sur le développement cérébral. Cette mutation est majoritairement retrouvée chez des patients atteints du syndrome de West ou d'Ohtahara, sans malformation cérébrale apparente. Nos analyses réalisées sur une lignée de souris knock-in pour cette mutation (GCG)7 ainsi que sur des rats après électroporation in utero ont montré que la migration des neurones glutamatergiques et GABAergiques ainsi que la maturation des neurones GABAergiques ne sont pas altérées par cette mutation. De façon intéressante, nos données suggèrent que les épilepsies observées chez les souris knock-in résulteraient plutôt d'une réorganisation du réseau glutamatergique. Etant donné que le gène ARX n'est pas exprimé dans les neurones glutamatergiques, l'ensemble de ce travail suggère que les épilepsies chez les souris knock-in pour la mutation Arx(GCG)7 sont la conséquence d'une altération développementale secondaire à la mutation initiale du gène. Des études ultérieures devraient nous aider à mieux définir les bases physiopathologiques de l'épilepsie chez ces patients afin d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour ce type de pathologies.

"An epilepsy-related ARX polyalanine expansion modifies glutamatergic neurons excitability and morphology without affecting GABAergic neurons development"

(En soumission, Brain)

Shirley Beguin^{1,2,3}, Hélène Becq^{1,2,3}, Valérie Crépel^{1,2,3}, Laurent Aniksztejn^{1,2,3}, Barbara Pelosi⁴, Massimo Pasqualetti⁴, Carlos Cardoso^{1,2,3}, Alfonso Represa^{1,2,3}

- 1) Inserm Unité 901, Marseille 13009, France
- 2) Aix-Marseille Université, UMR S901, Marseille 13009, France
- 3) INMED, Marseille 13009, France
- 4) Department of Biology University of Pisa, Italy

Abstract

Epileptic encephalopathies comprise a heterogeneous group of severe infantile disorders for which the pathophysiological basis of epilepsy is inaccurately clarified by genotypephenotype analyses. Because a deficit of GABA-neurons has been found in some of these syndromes, notably in patients with X-linked Lissencephaly with Abnormal Genitalia (XLAG), epilepsy was suggested to result from an imbalance in GABAergic inhibition, and the notion of "interneuronopathy" was proposed. Here, we studied the impact of a polyalanine expansion of Aristaless-related homeobox (ARX) gene, a mutation notably found in West and Ohtahara syndromes. Analysis of knock-in mice and rats expressing the same Arx mutation after *in utero* electroporation revealed that GABA-neuron migration and maturation is not affected. In contrast, our data indicate that epilepsy in Arx knock-in mice would result from a glutamate network remodeling and we therefore propose that these secondary alterations are instrumental for the development of disease-specific phenotypes.

A. Introduction

Epileptic encephalopathies comprise a large group of conditions in which cognitive function deteriorates as a consequence of epileptic activity^{1, 2}. Although different genes have been identified (reviewed in 2), the origin of the epileptic condition remains unclear in many cases. Furthermore, the high diversity of syndromes linked to a same gene and the observation that alterations of different genes yield the same phenotypes makes any clinical investigation problematic.

ARX (Aristaless-related homeobox) gene is implicated in a wide spectrum of X-linked neurological disorders which extend from less severe phenotypes characterized by mental retardation with no apparent brain developmental abnormalities to extremely severe phenotypes such as X-linked lissencephaly associated with abnormal genitalia (XLAG) (for review see 3-6). Thus far, Genotype-phenotype analysis has failed to clarify the biological/ pathophysiological basis for this pleiotropy.

It has been proposed that epileptogenesis in these patients could result primarily from a deficit of GABA inhibition⁷. Thus, *Arx* protein is highly expressed in GABA interneurons⁸⁻¹⁰ and has been found to be important for their tangential migration from the ganglionic eminences to the cortical fields^{8, 11, 12}. Furthermore, a decrease in GABA neurons has been reported in cortical samples from lissencephalic patients with ARX mutations¹³⁻¹⁵. However, it is known that the majority of ARX mutations are not associated with brain malformations⁶. This is the case for the insertion of seven tandem GCG repeats within the normal stretch of the first polyalanine tract (amino acids 100 to 115), a mutation reported to cause severe epilepsy syndromes: X-linked West syndrome¹⁶, infantile spasms and status distonicus¹⁷ and Ohtahara syndrome¹⁸. It is presently unclear whether this mutation also affects migration and differentiation of GABA interneurons. Two groups have reproduced this mutation in mice^{19, 20}. As compared to X-linked lissencephaly mice^{8, 19}, these mice display more moderate brain alterations but exhibit a severe epilepsy making it possible to evaluate, in relevant animal models, the contribution of an imbalance of GABA in epileptic manifestations.

In this report we analyzed $Arx^{(GCG)7/Y}$ mice¹⁹ and utilized an *in utero* electroporation model in rats to express the same Arx mutation in order to evaluate at both structural and electrophysiological levels how this mutation could impact GABAergic inhibition. We demonstrate here that GABA neurons which migrate to the cortical (and hippocampal) fields, remain unaffected by the mutation and, consistent with

this, the frequency of spontaneous GABA-mediated inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) in hippocampal neurons from $Arx^{(GCG)7/Y}$ mice does not differ from that of wild type animals. Surprisingly, our data further indicate that epilepsy in $Arx^{(GCG)7/Y}$ mice results from glutamatergic network reorganization as illustrated by a dramatic increase in the frequency of spontaneous excitatory glutamate-mediated postsynaptic currents (EPSCs) in CA1 pyramidal neurons together with an abnormal distribution of their axon collaterals. Because glutamatergic neurons do not express Arx, the morpho-functional changes described here most likely result from non-cell autonomous effects. This indicates that brain changes secondary to the original mutation strongly contribute to the development of disease-specific phenotypes.

B. Résultats

1. Migration of interneurons is unaffected by ARX (GCG)7 mutation.

Arx is highly expressed in interneurons⁸⁻¹⁰ and is required for their correct migration^{8, 11, 12}. However, previous studies suggest that ARX (GCG)7 mutation results in a relatively moderate loss of GABA interneurons in knock-in mice^{19, 20}. To determine whether this polyalanine expansion impairs the tangential migration of interneurons, we first performed directional in utero electroporation to specifically target interneuron progenitors in the ganglionic eminences of E15 rat embryos. Four days later, control cells transfected with a RFP plasmid (used as control) were found scattered throughout the ganglionic eminences and some had reached the cortex (4.1% \pm 0.86, n=9 embryos), migrating tangentially along the deep migratory stream (Fig. 1a, 1b left panel, 1c). In contrast, we found a significant reduction in the number of interneurons (1.19% \pm 0.35, n=9 embryos) in the cortex of animals transfected with shRNA vectors directed against ARX (Fig. 1b, middle panel). This is in agreement with previous data obtained *in vitro* with similar constructs¹². In addition, transfection with plasmids expressing the ARX (GCG)7 mutation did not modify the migratory pattern and morphological features of migrating interneurons (Fig. 1b, right panel), and did not affect the percentage of cells that reached the cortex $(3.38\% \pm 1.148)$ n=13 embryos). These results confirm that ARX is required for tangential migration and further shows that the ARX (GCG)7 mutation does not impair interneuronal migration in rats.



Figure 1: Migration of interneurons is unaffected by ARX (GCG)7 mutation after rat brain *in utero* electroporation.

(a) Rat brain coronal section after *in utero* electroporation of E15 ganglionic eminences with RFP construct alone. After 4 days, electroporated cells have migrated within the ganglionic eminence and have tangentially reached the cortex. Ctx: Cortex, LV: Lateral ventricle, GE: Ganglionic eminence. RFP cells appearin black. Scale bar: 500 μ m. (b) High magnification of the cortical ventricular zone, inset in (a), of mice electroporated with either RFP construct alone (control) or combined with the S2 shRNA or the ARX(GCG)7 human mutation. Scale bars: 100 μ m. (c) Quantitative analysis of the percentage (± s.e.m.) of electroporated cells found in the cortex versus the ganglionic eminence 4 days after electroporation for each condition. Control (n=9), S2 RNAi (n=9), ARX (GCG)7human (n=13). While Arx inactivation results in a clear reduction of electroporated cells migrated in the cortex (Mann & Whitney test, *P=0.027), the mutated form does not modify the number of cells migrating in the cortex.

Next, to evaluate whether the number of interneurons was reduced in mice with the ARX (GCG)7 mutation, we stained P14-P15 cortical and hippocampal sections with interneuronal markers GABA, ARX, Calbindin, Calretinin and Parvalbumin. Consistent with the observations made in rats, we found no alteration in the distribution or in the number of cells immunopositive for these markers in the neocortices and hippocampi of $Arx^{X/Y}$ mice and $Arx^{(GCG)7/Y}$ mice (**Fig. 2a-g and Supplementary Fig.1**).

Taken together, these data suggest that the migration of interneurons in rats and mice is unaffected by the ARX (GCG)7 mutation.



Figure 2: Cortical and hippocampal interneurons are preserved in Arx(GCG)7/Y mice.

(**a**,**b**,**c**,**d**,**e**) Immunostaining performed on cortical coronal sections at P14-P15 from Arx X/Y mice as control or Arx(GCG)7/Y mice with one of the following antibodies: (**a**) ARX; (**b**) GABA; (**c**) Calbindin (Cb); (**d**) Calretinin (Cr); (**e**) Parvalbumin (Pv). Scale bars: 100µm. (**f**) Quantification of immunostaining showing the percentage (± s.e.m.) of positive cells in the cortex per mm². No significant changes were found in the Arx(GCG)7/Y n=12 for ARX, GABA and Calretinin antibodies; ArxX/Y n=6, Arx(GCG)7/Y n=6 for Calbindin and Parvalbumin antibodies. (**g**) Quantification of immunostaining performed in hippocampus (see Supplementary Fig.1), showing the percentage of positive cells in the hippocampus per mm². No significant changes were found in the Arx(GCG)7/Y n=7, Arx(GCG)7/Y n=12 for ARX, GABA and Calretinin antibodies; antibodies is the hippocampus per mm². No significant changes were found in the Arx(GCG)7/Y n=6 for Calbindin and Parvalbumin antibodies. (**g**) Quantification of immunostaining performed in hippocampus (see Supplementary Fig.1), showing the percentage of positive cells in the hippocampus per mm². No significant changes were found in the Arx(GCG)7/Y mice. ArxX/Y n=7, Arx(GCG)7/Y n=12 for ARX, GABA and Calretinin antibodies. ArxX/Y n=6, Arx(GCG)7/Y n=6 for Calbindin and Parvalbumin antibodies.

2. Morphology of interneurons is unaffected by ARX (GCG)7 mutation.

Previous studies have suggested that alterations in the Arx gene could disrupt the morphology of interneurons^{11, 12}. We thus examined whether the ARX (GCG)7 mutation could result in an altered maturation of interneurons in primary cultures of rat hippocampal neurons. Transfections with plasmid constructs were performed at 3DIV, and GAD67 immunostaining was performed 72 hours later in order to specifically analyze the morphology of transfected interneurons (**Fig.3a-c**). When compared to control interneurons expressing a mismatch construct (n=33 cells) (**Fig. 3a**), we found that RNAi-mediated Arx knockdown in cultivated interneurons (n=36 cells) resulted in a wider neuritic outgrowth (**Fig. 3b**) as illustrated by significantly increased total dendritic length (31.78% \pm 9.47) and number of branch points (60.8% \pm 13.49) (**Fig. 3d-e**). In contrast, no major difference was observed in interneurons expressing the ARX (GCG)7 human mutation (n=12 cells) (**Fig.**

3c), when compared to those expressing ARX wild type human form (n=8 cells) or GFP as a control (n=28 cells) (**Fig. 3d-e**). These data show that Arx is required for interneuronal maturation and further suggest that (GCG)7 polyalanine expansion has no effect on interneuron morphology *in vitro*.



Figure 3: Dendritic arborization of interneurons in vitro is unaffected by ARX (GCG)7 mutation.

(a,b,c) GAD67 Immunostaining, on primary rat hippocampal cultures transfected at 3DIV, performed 72 hours after transfections with either GFP construct alone or combined with mismatch construct in (a) or S2 RNAi in (b) or ARX (GCG)7 human mutation in (c). Morphology of transfected cells appears in green and interneurons are specifically identified with the GAD67 immunostaining (in red). Scale bars: 50µm. (d) Quantification of the total dendritic length in transfected interneurons. ARX inactivation with S2 shRNA significantly increases the interneurons dendritic arborization compared with associated mismatch control considered as 100%, (Mann & Whitney test, *P=0.009). The ARX (GCG)7 human mutation and ARX WT human have no effect on the interneurons dendritic arborization compared with control GFP considered as 100%.(Control RNAi n=33, S2 RNAi n=36, Control GFP n=28, ARX WT human n=8, ARX (GCG)7 human n=12), Error bars: s.e.m. (e) Quantification of the number of branch point (± s.e.m.) in transfected interneurons. ARX inactivation with S2 RNAi significantly increases the number of interneuron branch points compared with associated mismatch considered as 100%, (Mann & Whitney test, *P=0.001). Neither human ARX (GCG)7 nor ARX WT human constructs modified the numbers of interneuron branch points compared with control GFP considered as 100%.(Control RNAi n=33, S2 RNAi n=36, Control GFP n=28, ARX WT human n=8, ARX (GCG)7 human n=12).

To further examine this issue in mice with the ARX (GCG)7 mutation, we reconstructed the dendritic arbor of stratum oriens interneurons injected with biocytin in acute hippocampal sections (**Supplementary Fig. 2**). We did not observe any significant change between $Arx^{X/Y}$ (n=6) and $Arx^{(GCG)7/Y}$ (n=6) mice neither in the total dendritic length (**Supplementary Fig. 2c**) nor in the number of branch points (**Supplementary Fig. 2d**). Overall, these results show that the ARX (GCG)7 mutation has no effect on interneuron morphology.

3. Migration of pyramidal neurons and cortical layering is unaffected by ARX (GCG)7 mutation.

Arx protein is expressed by neural progenitors in the cortical ventricular zone (VZ), but not by radially migrating pyramidal neurons^{4, 9, 10}. Since some defects in the organization of pyramidal neurons have been reported in patients with X-linked lissencephaly with abnormal genitalia¹⁴ and also in Arx mutant mice⁸, this gene has been proposed to play a role in the migration of cortical pyramidal neurons. In addition, Arx knockdown or its overexpression after in utero electroporation was reported to impair pyramidal cell migration¹². We thus investigated whether the ARX (GCG)7 mutation alters the migration of cortical pyramidal neurons. We transfected neural progenitors in the cortical VZ of E15 rat embryos and found that cells overexpressing the ARX wild-type human form accumulated in the VZ four days after electroporation (Supplementary **Fig.3d**); this is in agreement with a previous report¹². A similar phenotype was also observed after RNAi-mediated knockdown of Arx (Supplementary Fig 3a-c). When neural progenitors were transfected with the ARX (GCG)7 human mutation (Supplementary Fig.3e), we observed a phenotype similar to that obtained with the overexpression of the wild type form (Supplementary Fig.3f). Interestingly, when mutated or wild type ARX were expressed, we observed a clear tangential pattern of migration in some transfected cells (Supplementary Fig.4a-b), with a similar number of tangentially migrating cells in these two conditions (Supplementary Fig.4c). Because these cells appeared to behave like interneurons, we performed GABA immunostaining but none of these cells were found to be immunopositive, suggesting they were not interneurons (Supplementary Fig.4d-e).

Because Arx expression is downregulated upon cycle cell exit in physiological conditions⁴, ^{9, 10}, the impact of Arx on pyramidal neuron migration, as reported here and by others, is most likely due to its sustained expression in Arx-transfected cells. To confirm this hypothesis, we performed immunohistochemistry with Arx antibodies on cortical sections 2 days after transfection with RFP expression plasmids in E15 rat embryos. We observed that the majority of RFP-expressing cells had not reached the cortical plate at that time and were still migrating in the intermediate zone. Importantly, none of these RFP-expressing migrating pyramidal cells expressed Arx (Supplementary Fig.5a). In contrast, when ARX wild type human (not shown) or ARX (GCG)7 mutated form (Supplementary Fig.5b) were expressed, Arx expression was still detected in migrating pyramidal cells, as expected. This however does not exclude that the ARX mutation could affect the migration of pyramidal cells. To examine this issue, we studied the migration of cortical pyramidal neurons in mice with the ARX (GCG)7/Y mutation. We transfected neural progenitors in the cortical VZ of E14 Arx^{(GCG)7} mouse embryos with RFP expression plasmids in order to visualize migrating pyramidal neurons. Four days later, in both $Arx^{X/Y}$ and $Arx^{X/X}$ mice, RFP-expressing cells had reached the cortical plate (Fig.4a). We observed the same phenotype in $Arx^{(GCG)7/X}$ heterozygous females (Fig. 4b). Importantly, the migration of pyramidal neurons was also found to be unaffected in $Arx^{(GCG)7/Y}$ males (Fig. 4c), suggesting that ARX (GCG)7 mutation has no impact on migration of this cell type. To further evaluate this issue we examined the cortical layering in P14-15 mice with the ARX (GCG)7 mutation using immunostaining with cortical layer markers: CDP for the II-III-IV layers (Fig. 4e), FoxP2 for the V- VI layers (Fig. 4f) and Bc11b for the V layer (Fig.4g). We did not observe any significant difference in the thickness of the cortex or the cortical layers in $Arx^{X/Y}$ and $Arx^{(GCG)7/Y}$ mice (Fig.4h) and no clusters of ectopic pyramidal neurons were found. Moreover, the hippocampal layering was preserved in mutant mice (Fig.4i).



Figure 4: Migration of pyramidal neurons and cortical layering is unaffected by ARX (GCG)7 mutation

(**a,b,c**) Coronal sections of mouse brain 4 days after in utero electroporation with RFP control construct to visualize pyramidal cells performed at E14. Electroporated cells in ArxX/X, ArxX/Y (**a**) or Arx(GCG)7/X (**b**) mice mice have reached the cortical plate 4 days after in utero electroporation. Arx(GCG)7/Y mice electroporated cells (**c**) display similar distribution than wild-type mice ArxX/Y, ArxX/X or Arx(GCG)7/X mice. CP: Cortical Plate, VZ: Ventricular Zone. Scale bars: 200µm. (**d**) Quantitative evaluation of the relative position of electroporated cells (\pm s.e.m.) in 10 strata dividing the thickness of cortex (as seen in a) on ArxX/Y or ArxX/X mice (in dark blue, n=4), Arx(GCG)7/X mice (in light blue, n=3) and Arx(GCG)7/Y mice (in pink, n=3). No significant differences were detected. (**e,f,g**) Immunostainings performed at P14-P15 on ArxX/Y and Arx(GCG)7/Y brains with cortical layer markers : (**e**) CDP for layers II-III-IV, (**f**) FoxP2 for layers V-IV layers, and (**g**) Bc11b for layer V. Scale bars: 200µm. (h) Quantification of the cortical size (in white) and layer size (in colour) (mean mm \pm s.e.m.) on ArxX/Y (n=7) or Arx(GCG)7/Y (n=12) mice. Arx(GCG)7/Y mice have normal cortical layering compared with ArxX/Y mice. (i) Immunostaining of hippocampal sections performed at P14-P15 on ArxX/Y (n=6) and Arx(GCG)7/Y (n=6) mice with the neuronal marker NeuN. Scale bars: 200µm.

Taken together, these data show that the ARX (GCG)7 mutation does not affect cortical pyramidal cell migration and layer organization in the neocortex and hippocampus.

The cause of epilepsy in patients or mice with ARX (GCG)7 mutations is unknown however an imbalance in GABAergic inhibition is suspected. We investigated this issue by analyzing the excitatory (EPSCs) and inhibitory (IPSCs) post synaptic currents in CA1 pyramidal cells in acute hippocampal slices from $Arx^{(GCG)7/Y}$ and $Arx^{X/Y}$ mice; the intrinsic properties of the CA1 pyramidal cells were also investigated (Fig. 5a-h). EPSCs were recorded at $V_{\rm h}$ = -70mV corresponding to the reversal potential for GABAergic currents, and IPSCs were recorded at $V_{\rm h} = 0$ mV corresponding to the reversal potential for glutamatergic currents. Under these conditions, we observed a strong increase in EPSC frequency (~40%) in $Arx^{(GCG)7/Y}$ mice (n=24 cells) in comparison with $Arx^{X/Y}$ mice (n=16 cells) (Fig. 5c,5e). In contrast, the frequency of IPSCs was not significantly different in both groups of mice (Fig. 5c,5f). Accordingly, cell paired analysis of IPSC/EPSC frequency ratios revealed a drastic decrease (about 70%) in $Arx^{(GCG)7/Y}$ mice (n=24 cells) as compared to Arx^{X/Y} mice (n=16 cells) (Fig.5g). In addition, EPSC and IPSC amplitudes were unaffected in the mutant mouse (18.0 \pm 0.9 and 38.25 \pm 2.8 pA respectively; n=24) in comparison with control (20.3 + 1.7 and 33.5 + 3.8 pA respectively; n=16; p>0.05 (Fig.5d).This enhanced glutamatergic activity in CA1 pyramidal cells was not associated with significant changes in their intrinsic properties. Thus, in $Arx^{X/Y}$ (n = 13) and $Arx^{(GCC)7/Y}$ (n =23) mice, the resting membrane potential was -61.5 ± 1.9 mV and -59.3 ± 1.7 mV; the input resistance was 204 ± 12.5 MOhm and 235.1 ± 18.3 MOhm; spike threshold was of -

 33.6 ± 0.97 mV and -33.2 ± 0.74 mV, respectively. Moreover, the number of action potentials elicited by 5 incremental depolarizing current steps was similar in both groups of mice (**Fig. 5a, 5b**).

Importantly, we observed in $Arx^{(\text{GCG})^{7/Y}}$ mice a drastic shift of the inhibitory-excitatory synaptic balance toward excitation without any change in the intrinsic membrane properties of CA1 pyramidal neurons. We thus propose that this change in the excitatory drive could promote epileptiform activity. To further assess this hypothesis, we performed field potential recordings in the CA1 area of hippocampal slices from $Arx^{(\text{GCG})^7}$ and $Arx^{X/Y}$ mice. In the absence of any pharmacological treatment, we observed spontaneous epileptiform discharges in slices from $Arx^{(\text{GCG})^{7/Y}}$ mice moreover we observed both interictal (8 out of 28 slices, average frequency = 0.18 ± 0.06 Hz, average duration = 1020.8 ± 203.7 ms) and ictal discharges (6 out of 28 slices, average duration = 26231.25 ms) (**Fig.5h**). In contrast, no epileptiform activity was present in $Arx^{X/Y}$ mice. This observation is unique since spontaneous epileptiform activity is rarely observed in the absence of pharmacological treatment in slices from animal models of epilepsy and/or resected tissue from epileptic patients^{21,22}.



Figure 5: Glutamatergic drive is increased in the CA1 field of Arx(GCG)7 mice.

(a) Pattern of discharge of CA1 pyramidal cells from ArxX/Y (left) and Arx(GCG)7/Y mice (right) after injection of a 60 pA depolarizing and hyperpolarizing current steps (1 sec duration) applied from their resting membrane potentials. (b) Average number of action potentials evoked by 20 to 100 pA current pulses in ArxX/Y (n = 12), and in Arx(GCG)7/Y mice (n = 12).

(c) Pattern of spontaneous excitatory (EPSCs, Vh = -70 mV) and inhibitory (IPSCs, Vh = 0 mV) post

synaptic current discharge in CA1 pyramidal cells of ArxX/Y and Arx(GCG)7/Y mice. (d) Cumulative probability plots for EPSC (top) and IPSC (bottom) amplitude. No significant change was found between ArxX/Y (n = 16) and Arx(GCG)7/Y mice (n = 24, Kolmogorov-Smirnov Two sample test, p> 0.05). (e) Quantification of EPSC frequency on ArxX/Y (n=16 cells) and Arx(GCG)7/Y mice (n=24 cells). The mean EPSC frequency (± s.e.m.) is significantly increased in Arx(GCG)7/Y mice (t-test, *: P=0.013). (f) Quantification of IPSC frequency on ArxX/Y (n=16 cells) and Arx(GCG)7/Y mice (n=24 cells). No significant change was found between ArxX/Y and Arx(GCG)7/Y mice (p> 0.05). (g) Quantification of cell paired IPSC/EPSC frequency ratio of ArxX/Y (n=16 cells) and Arx(GCG)7/Y mice (n=24 cells). This ratio is significantly decreased in Arx(GCG)7/Y mice, leading to a significant enhancement of the glutamate drive in these mice (Mann & Whitney test, **: P<0.001). (h) CA1 field recordings. Upper panel: pattern of Interictal Epileptiform Discharges (IEDs). Middle panel: high magnification pattern of one IED. Lower panel: pattern of one Interictal Discharge (ID).

Taken together, these data show a drastic increase of glutamatergic activity in $Arx^{(GCG)7/Y}$ mice, whereas GABAergic activity remains unchanged. They further suggest that epilepsy in these mice is due to an increase of the excitatory drive rather than an inhibitory failure.

5. Axonal fibers in CA1 pyramidal cells are abnormal in Arx^{(GCG)7} mice.

The presence of recurrent epileptiform bursts and increased glutamatergic activity which we observed in the CA1 hippocampal field, is in favor of synaptic remodeling similar to that previously reported in temporal lobe epilepsy^{23, 24}. To address this question, we analyzed the morphology of CA1 pyramidal cells in $Arx^{(GCG)7/Y}$ and $Arx^{X/Y}$ mice. We found that 45% of cells in $Arx^{(GCG)7}$ mice displayed abnormal axonal recurrent fibers, with collateral branches crossing the pyramidal cell layer and terminating into the stratum radiatum (**Fig.6a-b, Supplementary Fig.6**). This type of axonal collateral was never observed in $Arx^{X/Y}$ mice. Axonal sholl analysis revealed that branching in proximal axonal projections (50µm from soma) was significantly increased in cells from $Arx^{(GCG)7/Y}$ mice when compared to those of $Arx^{X/Y}$ mice (**Fig.6c**). Moreover, branching in basal dendrites located 200µm away from the soma was significantly increased in cells with recurrent fibers in $Arx^{(GCG)7}$ mice, as compared to cells in $Arx^{X/Y}$ mice (**Fig.6d**).



Figure 6: Axonal fibers in CA1 pyramidal cells are abnormal in Arx(GCG)7 mice.

(a) Confocal image of an ArxX/Y mouse CA1 pyramidal cells of after biocytin staining (left panel), and its associated Neurolucida reconstruction (right panel, cell body in green, dendrites in blue and axon in red). S.o: Stratum oriens. S.p: Stratum pyramidale. S.r: Stratum radiatum. Scale bar: 50µm. Lower panel shows the axonogram of this cell. (b) Confocal image of an Arx(GCG)7/Y mouse CA1 pyramidal cells of after biocytin staining (left panel), and associated Neurolucida graph reconstruction (right panel, cell body in green, dendrites in blue and axon in red). CA1 pyramidal cells of Arx(GCG)7/Y mice present abnormal axonal recurrents reaching the stratum radiatum (Arrows). S.o: Stratum oriens. S.p: Stratum pyramidale. S.r: Stratum radiatum. Scale bar: 50µm. Lower panel shows the axonogram of this cell. (c) Sholl analysis of axons of CA1 pyramidal cells of ArxX/Y mice (n=19, in blue) Arx(GCG)7/Y mice with recurrent fibers (n=9, in pink) and without recurrent fibers (n=10, in green). The mean number (± s.e.m.) of axonal crossings is significantly increased at a distance of 50µm from the soma when Arx(GCG)7/Y mouse cells present recurrent fibers, compared with cells from ArxX/Y mice (Mann & Whitney test, *: P=0.004). (d) Sholl analysis performed on dendrites of CA1 pyramidal cells of ArxX/Y mice (n=20, in blue) and Arx(GCG)7/Y mice cells without recurrent fibers (n=11, in green) or with recurrent

fibers (n=9, in pink). Distance from soma -250 μ m to 0 μ m represents apical dendrites, Distance from soma 0 to 350 μ m represent basal dendrites. The mean number (± s.e.m.) of basal dendrite crossings is significantly increased at the distance of 200 μ m from the soma when Arx(GCG)7/Y mouse cells present recurrent fibers, compared with ArxX/Y mouse cells (Mann & Whitney test, *: P=0.007).

Taken together, these results show that axonal arborization in CA1 pyramidal cells is abnormal in $Arx^{(GCG)7/Y}$ mice and may reflect network reorganization contributing to epilepsy.

C. Discussion

Arx gene is required for the proper migration of cortical and hippocampal GABA interneurons^{8,11,12}. It was thus proposed that the early onset epileptic encephalopathies associated with ARX mutations could be considered as interneuronopathies⁷. Analyses of reported cases⁶ indicate that ARX-related syndromes can be segregated at the molecular level into two categories: 1) mutations predicted to lead to *ARX* loss-of-function associating severe brain malformations (e.g. XLAG syndrome), and 2) polyalanine expansions leading to milder phenotypes with no apparent brain malformation. In this report, we demonstrate that the expansion of the first polyalanine tract of ARX gene, the most frequent mutation leading to X-linked West syndrome¹⁶ and Ohtahara syndrome¹⁸, does not necessarily alter GABA interneuron development. This notion is supported by four different sets of data: i) the migration of cortical interneurons expressing the ARX (GCG)7 human mutation after in utero electroporation is not affected; ii) the density and distribution of cortical and hippocampal interneurons is normal in mice with ARX(GCG)7 mutation; iii) the dendritic arborization is normal both in cultivated hippocampal interneurons expressing ARX (GCG)7 human mutation and in brain sections from $Arx^{(GCG)7}$ mice; iv) the frequency of spontaneous IPSCs in CA1 pyramidal neurons from $Arx^{(GCG)7}$ mice is not different from controls. Therefore, we propose that ARX mutations can yield either a severe brain malformation (lissencephaly) related to detective GABA neuron migration associating severe epilepsy, or milder cortical phenotypes with no malformation and no GABA defect but also associating severe epilepsy.

Hence, the data reported here contribute to the clarification of genotype-phenotype

correlations in ARX syndromes. Our conclusion however is complicated by the complexity and morpho-functional diversity of cortical GABA neurons populations^{25, 26} which could potentially prevent the detectection of subtle changes caused by the ARX (GCG)7 mutation. In addition, the phenotype could be altered depending on the genetic background of the mice²⁷. It was reported in a mixed strain N2 mice (i.e.20) that a similar polyalanine expansion had a moderate impact on cortical interneurons characterized by a selective reduction of calbindin interneurons without affecting other subtypes.

Although it has been suggested that alterations in the Arx gene can lead to defects in pyramidal cell migration¹², here we show that the ARX (GCG)7 mutation does not impair radial migration in knock-in mice. Moreover, cortical layering is normal in mice with ARX (GCG)7 mutation, which is consistent with the absence of brain malformation in patients harboring a similar mutation¹⁷.

The most interesting observation concerns the axonal rearrangement of CA1 pyramidal neurons in $Arx^{(GCG)7/Y}$ mice, which likely contributes to neuronal excitability and synchronization by increasing local excitatory recurrent networks. We think that this alteration could result from a non cell autonomous mechanism, since migrating and differentiating pyramidal neurons do not express Arx. It is interesting to note that a similar remodeling of axonal networks has been described earlier, in the hippocampus of adult epileptic rats^{23, 24} and was proposed to contribute to epilepsy. In $Arx^{(GCG)7/Y}$ mice, this feature would be developmentally acquired and either result from an abnormal axonal outgrowth or a lack of regression of abnormal collaterals²⁸. How the ARX mutation in interneurons actually contributes to this change remains to be elucidated.

It has been well illustrated by Kitamura and coworkers (2009) that $Arx^{(GCG)7/Y}$ mice display severe spontaneous seizures starting with limb clonus and progressing to tonicclonic generalized convulsions¹⁹. Here, we show that some acute slices from $Arx^{(GCG)7/Y}$ mice display spontaneous seizure-like episodes in the absence of any treatment, while slices from most animal models of epilepsy rarely display similar features. The spontaneous epileptic manifestations reported here emphasize the degree of epileptogenicity resulting from the ARX (GCG)7 mutation and its consequences on local networks within hippocampal slices. Hence, the fact that epilepsy in $Arx^{(GCG)7/Y}$ mice originate in the hippocampus (see also19) and have a glutamatergic origin has important therapeutic implications which require further investigation.

To conclude, we propose that epilepsy in $Arx^{(GCG)7/Y}$ mice could appear as a consequence of a developmental alteration secondary to the initial gene mutation. We recently reported in a rat model of subcortical band heterotopia that alterations are observed not only in the

malformation itself, but also in the normal cortex surrounding the malformation, where an increased glutamatergic drive but no GABAergic alterations were found²⁹. Therefore, neuronal network remodeling during abnormal cortical development could be a common feature underlying epilepsy in such developmental disorders. This remodeling could modify the initial phenotype, contribute to the diversity of clinical manifestations linked to single gene mutations, and account for the protracted delay between the initial lesion and the onset of clinical epilepsy.

D. Figures supplémentaires



<u>Supplementary Figure 1:</u> GABAergic neurons subtypes immunostained in Arx(GCG)7 mice hippocampus.

(**a,b,c,d,e**) Immunostaining performed on hippocampal coronal sections at P14-P15 from ArxX/Y mice used as control or Arx(GCG)7/Y mice with : (**a**) ARX antibody; (**b**) GABA antibody; (**c**) Calbindin antibody; (**d**) Calretinin antibody; (**e**) Parvalbumin antibody. Quantitative analyses are presented in **Fig.2**. Scale bars: 200µm.



<u>Supplementary Figure 2:</u> Arx(GCG)7 mice hippocampal interneurons display a normal dendritic arborization.

(a) Representative morphology of one ArxX/Y mouse hippocampal interneuron (stratum oriens) after biocytin revelation. Scale bar: 20 μ m. (b) Representative morphology of one Arx(GCG)7/Y mouse hippocampal interneuron (stratum oriens) after biocytin revelation. Scale bar: 20 μ m. (c) Quantification of the total dendritic length (± s.e.m.) of hippocampal interneurons (stratum oriens) from ArxX/Y mice (n=6) or Arx(GCG)7/Y mice (n=6). No significant changes were found (t-test, P=0.993). (d) Quantification of dendritic branch point numbers (± s.e.m.) of hippocampal interneurons (stratum oriens) performed in ArxX/Y mice (n=6) or in Arx(GCG)7/Y mice (n=6). No significant change was found in these mice (Mann & Whitney test, P=0.585).



<u>Supplementary Figure 3:</u> The overexpression of ARX (GCG)7 human mutation in pyramidal progenitors leads to an abnormal radial migration after rat brain in utero electroporation.

(a,b) Coronal sections of rat brain 4 days after in utero electroporation performed at E15 with either control RFP construct alone or combined with S2 shRNA. Scale bars: 200μ m (a) Electroporated cells with the RFP control construct have reached the cortical plate. CP: Cortical Plate, VZ: Venticular zone. (b) Arx inactivation with S2 RNAi leads to an abnormal radial migration as described before12. (c) Relative position of electroporated cells (± s.e.m.) in 10 strata dividing the thickness of cortex (see in a) for control RFP construct alone (in blue, n=7) and S2 RNAi (in green, n=8), (Mann & Whitney test, *: P<0,05. **: P<0,001). (d,e) Coronal sections of rat brain 4 days after in utero electroporation performed at E15 with either control RFP construct combined with ARX WT human or ARX (GCG)7 human mutation. Scale bars: 200µm (d) ARX WT human overexpression leads to an accumulation of electroporated cells in the ventricular zone. (e) ARX (GCG)7 human mutation also impairs pyramidal cells migration, and electroporated cells remain in the ventricular zone. (f) Relative position of electroporated cells (± s.e.m.) in 10 strata dividing the thickness of cortex (see in a) for ARX WT human (in brown, n=12) ARX (GCG)7 human mutation (in pink, n=12). No significant change was found between the ARX WT human and the ARX (GCG)7 human mutation.



<u>Supplementary Figure 4:</u> The overexpression of ARX (GCG)7 or ARX WT human constructs induces a tangential migration of pyramidal cells.

(**a,b**) Coronal sections of rat brain 4 days after in utero electroporation performed at E15 with control RFP construct combined either with ARX WT human construct in (**a**) or with ARX(GCG)7 human mutation in (**b**). (**a,b**) Some electroporated cells have reached the cortex with a tangential orientation (white arrows). Ctx: Cortex. GE: Ganglionic Eminence. LV: lateral ventricle. Scale bars: 200 μ m. (**c**) Relative quantification of the number of tangential migrating cells (% ± s.e.m.) compared to the number of radial migrating cells 4 days after electroporation with ARX WT human (n=12) and ARX (GCG)7 human mutation (n=12). No significant changes were found between these two conditions (t-test, P=0.086). (**d,e**) Ventricular zone high magnification of an immunostaining with GABA antibody (in green) performed on a rat brain coronal section 4 days after the in utero electroporated cells express the GABAergic marker (white arrows), indicating that these cells are not interneurons. VZ: Ventricular zone. LV: Lateral Ventricle. Scale bars: 100 μ m.


<u>Supplementary Figure 5:</u> Maintaining ARX expression in migrating pyramidal cells progenitors leads to abnormal radial migration.

(**a,b**) Arx immunostaining (in green) on rat brain coronal sections 2 days after in utero electroporation performed at E15 with control RFP construct alone in (**a**) (n=5) or combined with ARX(GCG)7 human mutation in (**b**) (n=5) and associated ventricular zone high magnification (right panel). Scale bars: 100μ m, for high magnification: 50μ m. While migrating electroporated cells with control RFP construct do not express ARX (Merge and ventricular zone high magnification in (**a**)), migrating electroporated cells with ARX (GCG)7 human mutation constructs still express Arx (Merge and ventricular high magnification in (**b**)), suggesting that the impairment of radial migration is due to the sustained expression of ARX; in other words, an appropriate radial migration requires the down regulation of ARX. LV: Lateral Ventricle.



<u>Supplementary Figure 6:</u> 45% of CA1 pyramidal cells in Arx(GCG)7 mice have abnormal morphology. (a) Representative morphology of CA1 pyramidal cells in Arx(Y mice. n=20. (b) Representative morphology of CA1 pyramidal cells in Arx(GCG)7 mice. n=20. Cell bodies are in green, dendrites are in blue and axons are in red. Stars mark cells which show axonal recurrent fibers (9 cells out of 20 analyzed cells). * point cells presenting axonal recurrents. Arrows point to examples of axonal recurrents. S.o: Stratum oriens. S.p: Stratum pyramidale. S.r: Stratum radiatum.

E. Méthodes

Animals

For our study, Wistar rats (Janvier, France) were used. Mouse experiments were performed on $Arx^{(CGC)^7}$ (330 position) knock-in mice (developed and kindly provided by Dr. Kunio Kitamura, Mistubishi Kagaku Insitute of Life Sciences) available in the RIKEN Bio Resource Center in Japan (strain name: Arx (GCG)7-1 KI (B6), RBRC03654). Mice were maintained by crossing heterozygous females ($Arx^{(GCG)7/X}$) with wild-type males C57BL/6J. Genotyping was performed according to the protocol of the RIKEN Bio Resource Center. All animal handling and care procedures were in accordance with the European Union and French legislation.

Plasmid constructs

For control experiments, pCAGIG vectors (Addgene) or pCAGGS-red fluorescent protein (RFP, gift from Dr. LoTurco) were used.

RNAi experiments were made with the S2 ShRNA (RNAi) targeting nucleotides 594-616 and its corresponding negative mismatch control S2m¹². The S2 ShRNA and S2m were subcloned into the mU6pro vector (Gift from Dr. LoTurco).

The human ARX (GCG)7 cDNA³⁰ was inserted into the EcoRI-EcoRV sites of the pCAGIG vector generating the pCAGIG- ARX(GCG)7 plasmid.

In order to generate the wild type human ARX cDNA, the primers CTAAGAGCAGCAGCGCCCCGT and CGTCCTCCAGCAGTTCCTCTTC were used to PCR amplify from wild type human genomic DNA a 536 bp fragment containing the region of the first polyalanine stretch.

To obtain the pCAGIG-ARX expression vector, the amplified fragment was digested with NaeI-EcoNI and then subcloned in the NaeI-EcoNI of the pCAGIG- ARX(GCG)7 plasmid to replace the fragment containing the (GCG)7 expansion.

The newly generated plasmids were fully sequenced to exclude the presence of mutations.

Plasmids used for *in utero* electroporation were prepared using the EndoFree Plasmid kit (Qiagen).

In utero electroporation

Timed pregnant rats (E15) or mice (E14) were anesthetized with ketamine/xylazine (100mg/kg and 10mg/kg respectively). The uterine horns were exposed. 1-2 µl of DNA plasmid (pCAGGS-red fluorescent protein (RFP) either alone (1.5 µg/µl) or combined (0.5µg/µl) with 1.5 µg/µl of S2 shRNA construct or ARX WT human or ARX (GCG)7 human combined with Fast Green (2mg/ml, Sigma, St. Louis) were injected into the lateral ventricle of each embryo with a pulled glass capillary and a microinjector (Picospritzer II, General Valve Corporation, Fairfield, USA). Electroporation was then conducted by discharging a 4000 µF capacitor charged to 50V with a BTX ECM 830 electroporator (BTX Harvard Apparatus, Holliston, MA). Five electric pulses (5ms duration) were delivered at 950ms intervals with electrodes (5mm for rats, 7mm for mice) placed to target either cortical ventricular progenitors or ganglionic eminence progenitors. Embryos were then allowed to develop for 4 days, and the positions of transfected cells were analyzed on a laser-scanning confocal microscope (FluoView 300; Olympus). Cortical quantification was performed with the eCELLence software (www.gvt.it/ecellence) on coronal sections (100 μ m) located in the dorso-lateral neocortex. Relative positions of transfected cells were estimated by counting RFP-positive cells in 10 areas from deep to superficial layers and calculated in percentage compared to the total number of electroporated cells.

Analyses of interneurons migration were conducted on coronal sections $(100\mu m)$ with the ImageJ software 1.44j. The number of electroporated cells in the cortex and in the ganglionic eminence was counted, and the percentage of electroporated cells in the cortex versus the ganglionic eminence was calculated for each section.

Immunohistochemistry and antibodies

Rat or mouse brains were rapidly removed and fixed (embryonic brains) or perfused (post natal brains) with Antigenfix solution (Diapath). Brains were then embedded in 4% agar and sectioned at 100µm with a Vibratome (Microm). Sections were blocked with 5% normal goat serum in PBS and 0,3% Triton X-100 for 1h and incubated with the appropriate primary antibody overnight at 4°C, for interneuron quantification : ARX (gift from Dr. Chelly, 1/1000), GABA (Sigma, 1/16000), Calbindin (Chemicon, 1/1000), Calretinin (Chemicon, 1/1000), Parvalbumin (Sigma, 1/1000); for neurons staining : NeuN (Millipore, 1/500); for cortical layer analysis : CDP (M-222 Santa Cruz, 1/100), FoxP2 (Abcam, 1/500), Bc11b (Novus biological, 1/250). After three washes in PBS, sections were incubated with either Alexa Fluor 488 or 647 or 555–conjugated secondary antibody (Invitrogen) in a 1:500

dilution at room temperature for 2 h, washed and mounted with Fluoromount G mounting medium (SoutherBiotech). Images were acquired with a laser-scanning confocal microscope (FluoView 300; Olympus) or with an Apotome (Zeiss).

Interneuron quantification was performed with the ImageJ software 1.44j. Positive cells were counted in a pixel square containing all cortical layers and then, we reported these numbers in percentage of positive cells per millimeter compared to the control condition considered as 100 percent. Cortical layer analyses were made with the ImageJ software 1.44j. The cortical thickness of each cortical layer was measured in millimeters for each analyzed section.

Primary hippocampal cultures, transfections and immunocytochemistry

Hippocampal neurons from 18-day-old rat embryos were dissociated using trypsin and plated at a concentration of 200 000 cells/ml in minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% NU serum (Becton Dickenson), 0.45% glucose, 1mM sodium pyruvate, 150mM Hepes and 10 IUml⁻¹ penicillin–streptomycin. Transfections of 3 DIV neuronal cultures were performed with the Combimag reagent (OZ-Biosciences) according to the manufacturer's protocol. Transfection was terminated by the substitution of 90% of the incubation solution with fresh culture media. Cells were fixed in Antigen solution (Diapath) 3 days after transfection. After three washes in PBS, cells were blocked with 5% normal goat serum in PBS and 0,3% Triton X-100 for 1h and incubated with the GAD67 primary antibody (Millipore, 1/500) overnight at 4°C. After three washes in PBS, cells were incubated with either Alexa Fluor 555–conjugated secondary antibody (Invitrogen) in a 1:500 dilution at room temperature for 2 h, washed and mounted with Fluoromount G mounting medium (SoutherBiotech). Cells positive for GAD67 staining were analyzed on a laser-scanning confocal microscope (FluoView 300, Olympus). Morphological analyses were performed on the ImageJ software 1.44j with the NeuronJ plugin.

Electrophysiological recordings

Knock-in mice *Arx*^{(GCG)7/Y} were decapitated under deep isoflurane anesthesia (20–40 mg/kg). The brain was removed rapidly, the hippocampi were dissected, and transverse 400-μM-thick hippocampal slices were cut using a HM650V MicroM tissue slicer in a solution containing the following (in mM): 110 choline, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 7 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, and 7 D-glucose (5°C). Slices were then transferred for rest at room temperature (1 h) in oxygenated normal artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing the

following (in mM): 126 NaCl, 3.5 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 1.3 MgCl₂, 2.0 CaCl₂, and 10 D-glucose, pH 7.4.

Individual slices were then transferred to the recording chamber, where they were fully submerged and superfused with ACSF at 32°C at a rate of 2–3 ml/min.CA1 pyramidal cells were recorded in whole cell configuration in current clamp mode with microelectrodes filled with a solution containing (in mM): 130 KM₂SO₄, 10 KCl, 0.1 CaCl₂, 1.1 EGTA, 10 HEPES, 4 Mg²⁺ ATP, and 0.3 Na⁺ GTP, pH 7.25; 270–280 mOsm or in voltage clamp mode with microelectrodes containing (in mM) :130 CsGlu, 10 CsCl, 0.1 CaCl₂, 1.1 EGTA, 10 HEPES, 4 Mg²⁺ ATP, and 0.3 Na⁺ GTP. Biocytin (0.5%) was added to the pipette solution for *post hoc* reconstruction.

Whole-cell measurements in voltage-clamp or current-clamp mode using a Multiclamp 700A amplifier (Axon Instruments, Molecular Devices, Union City, CA). Data were filtered at 2-3 kHz, digitized (20 kHz) with a Digidata 1200 and 1322A (Molecular Devices) to a personal computer, and acquired using Axoscope 7.0 and Clampex 9.2 softwares (PClamp, Axon Instruments, Molecular Devices). Signals were analyzed off-line using MiniAnalysis 6.0.1 (Synaptosoft, Decatur, GA), and Clampfit 10.1 (Molecular Devices).

Extracellular recordings were performed with a glass pipette filled with ACSF and positioned in CA1 stratum pyramidale; the signal was recorded with a DAM80 amplifier (WPI).

All values are given as means \pm SEM. The level of significance was set at p < 0.05. *n* refers to the number of cells, except when otherwise stated.

Biocytin staining and analysis

Hippocampal slices were fixed with Antigenfix (Diapath) overnight at 4°C. After three washes in PBS, slices were incubated in PBS 20% sucrose overnight at 4°C. Slices were then frozen in liquid nitrogen for cryoprotection, and washed three times in PBS. Sections were blocked with 5% normal goat serum in PBS and 0,5% Triton X-100 for 1 h at room temperature. Slices were incubated with Streptavidine Cy3 (GE Healthcare, 1/1000) in PBS 0.3% Triton and normal goat serum (1/200), overnight at room temperature. After three washes in PBS, sections were mounted with Fluoromount G mounting medium (SoutherBiotech). Biocytin positive cells were imaged with a laser-scanning confocal microscope (FluoView 300, Olympus) and analyzed with the Neurolucida software (mbf Bioscience).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SigmaStat 3.1 (Systat Software). A two-sample Student's t-test was used to compare means of two independent groups if distribution of data were normal. When the normality test failed, the non-parametric Mann-Whitney test was used.

Acknowledgment

We thank Lamine Bouamrane and Emmanuelle Buhler for technical support; Drs Jean-Bernard Manent and Louisa Christie for critically reading the manuscript and Dr K Kitamura and Riken for kindly providing knockin mice.

<u>Financial support</u>: Agence Nationale de la Recherche (RPV06055ASA); European community contract number LSH-CT-2006-037315 (EPICURE) FP6-Thematic priority LIFESCIHEALTH; Fondation pour la recherche médicale 2010; Fondation pour la recherche sur le cerveau-Rotary club de France 2010; INSERM; Centre National de la Recherche Scientifique to A.R.

F. Bibliographie

1. Korff, C.M. & Nordli, D.R.J. Epilepsy syndromes in infancy. Pediatr. Neurol. 34, 253-63(2006).

2. Nabbout, R. & Dulac, O. Epileptic syndromes in infancy and childhood. Curr. Opin. Neurol. **21**, 161-6(2008).

3. Kato, M., Das, S., Petras, K., Kitamura, K., Morohashi, K., Abuelo, D.N. et al. Mutations of ARX are associated with striking pleiotropy and consistent genotype-phenotype correlation. Hum. Mutat. 23, 147-59(2004).

4. Friocourt, G., Poirier, K., Rakic, S., Parnavelas, J.G. & Chelly, J. The role of ARX in cortical development. Eur. J. Neurosci. 23, 869-76(2006).

5. Gecz, J., Cloosterman, D. & Partington, M. ARX: a gene for all seasons. Curr. Opin. Genet. Dev. 16, 308-16(2006).

6. Shoubridge, C., Fullston, T. & Gecz, J. ARX spectrum disorders: making inroads into the molecular pathology. Hum. Mutat. 31, 889-900(2010).

7. Kato, M. & Dobyns, W.B. X-linked lissencephaly with abnormal genitalia as a tangential migration disorder causing intractable epilepsy: proposal for a new term, "interneuronopathy". J. Child Neurol. 20, 392-7(2005).

8. Kitamura, K., Yanazawa, M., Sugiyama, N., Miura, H., Iizuka-Kogo, A., Kusaka, M. et al. Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. Nat. Genet. 32, 359-69(2002).

9. Colombo, E., Galli, R., Cossu, G., Gecz, J. & Broccoli, V. Mouse orthologue of ARX, a gene mutated in several X-linked forms of mental retardation and epilepsy, is a marker of adult neural stem cells and forebrain GABAergic neurons. Dev. Dyn. 231, 631-9(2004).

10. Poirier, K., Van Esch, H., Friocourt, G., Saillour, Y., Bahi, N., Backer, S. et al. Neuroanatomical distribution of ARX in brain and its localisation in GABAergic neurons. Brain Res. Mol. Brain Res. **122**, 35-46(2004).

11. Colombo, E., Collombat, P., Colasante, G., Bianchi, M., Long, J., Mansouri, A. et al. Inactivation of Arx, the murine ortholog of the X-linked lissencephaly with ambiguous genitalia gene, leads to severe disorganization of the ventral telencephalon with impaired neuronal migration and differentiation. J. Neurosci. 27, 4786-98(2007).

12. Friocourt, G., Kanatani, S., Tabata, H., Yozu, M., Takahashi, T., Antypa, M. et al. Cell-autonomous roles of ARX in cell proliferation and neuronal migration during corticogenesis. J. Neurosci. 28, 5794-805(2008).

13. Bienvenu, T., Poirier, K., Friocourt, G., Bahi, N., Beaumont, D., Fauchereau, F. et al. ARX, a novel Prd-class-homeobox gene highly expressed in the telencephalon, is mutated in X-linked mental retardation. Hum. Mol. Genet. **11**, 981-91(2002).

14. Okazaki, S., Ohsawa, M., Kuki, I., Kawawaki, H., Koriyama, T., Ri, S. et al. Aristaless-related homeobox gene disruption leads to abnormal distribution of GABAergic interneurons in human neocortex: evidence based on a case of X-linked lissencephaly with abnormal genitalia (XLAG). Acta Neuropathol 116, 453-62(2008).

15. Marcorelles, P., Laquerriere, A., Adde-Michel, C., Marret, S., Saugier-Veber, P., Beldjord, C. et al. Evidence for tangential migration disturbances in human lissencephaly resulting from a defect in LIS1, DCX and ARX genes. Acta Neuropathol 120, 503-15(2010).

16. Stromme, P., Mangelsdorf, M.E., Scheffer, I.E. & Gecz, J. Infantile spasms, dystonia, and other X-linked phenotypes caused by mutations in Aristaless related homeobox gene, ARX. Brain Dev. 24, 266-8(2002).

17. Guerrini, R., Moro, F., Kato, M., Barkovich, A.J., Shiihara, T., McShane, M.A. et al. Expansion of the first PolyA tract of ARX causes infantile spasms and status dystonicus. Neurology 69, 427-33(2007).

18. Absoud, M., Parr, J.R., Halliday, D., Pretorius, P., Zaiwalla, Z. & Jayawant, S. A novel ARX phenotype: rapid neurodegeneration with Ohtahara syndrome and a dyskinetic movement disorder. Dev Med Child Neurol 52, 305-7(2010).

19. Kitamura, K., Itou, Y., Yanazawa, M., Ohsawa, M., Suzuki-Migishima, R., Umeki, Y. et al. Three human ARX mutations cause the lissencephaly-like and mental retardation with epilepsy-like pleiotropic phenotypes in mice. Hum. Mol. Genet. **18**, 3708-24(2009).

20. Price, M.G., Yoo, J.W., Burgess, D.L., Deng, F., Hrachovy, R.A., Frost, J.D.J. et al. A triplet repeat expansion genetic mouse model of infantile spasms syndrome, Arx(GCG)10+7, with interneuronopathy, spasms in infancy, persistent seizures, and adult cognitive and behavioral impairment. J. Neurosci. 29, 8752-63(2009).

21. Huberfeld, G., Menendez de la Prida, L., Pallud, J., Cohen, I., Le Van Quyen, M., Adam, C. et al. Glutamatergic pre-ictal discharges emerge at the transition to seizure in human epilepsy. Nat. Neurosci. 14, 627-34(2011).

22. Liotta, A., Caliskan, G., ul Haq, R., Hollnagel, J.O., Rösler, A., Heinemann, U. et al. Partial disinhibition is required for transition of stimulus-induced sharp wave-ripple complexes into recurrent epileptiform discharges in rat hippocampal slices. J. Neurophysiol. 105, 172-87(2011).

23. Lehmann, T.N., Gabriel, S., Kovacs, R., Eilers, A., Kivi, A., Schulze, K. et al. Alterations of neuronal connectivity in area CA1 of hippocampal slices from temporal lobe epilepsy patients and from pilocarpine-treated epileptic rats. Epilepsia 41 Suppl 6, S190-4(2000).

24. Esclapez, M., Hirsch, J.C., Ben-Ari, Y. & Bernard, C. Newly formed excitatory pathways provide a substrate for hyperexcitability in experimental temporal lobe epilepsy. J. Comp. Neurol. 408, 449-60(1999).

25. Klausberger, T. & Somogyi, P. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. Science 321, 53-7(2008).

26. Gelman, D.M. & Marín, O. Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex. Eur. J. Neurosci. 31, 2136-41(2010).

27. Frankel, W.N. Genetics of complex neurological disease: challenges and opportunities for modeling epilepsy in mice and rats. Trends Genet. 25, 361-7(2009).

28. Aniksztejn, L., Demarque, M., Morozov, Y., Ben-Ari, Y. & Represa, A. Recurrent CA1 collateral axons in developing rat hippocampus. Brain Res. 913, 195-200(2001).

29. Ackman, J.B., Aniksztejn, L., Crépel, V., Becq, H., Pellegrino, C., Cardoso, C. et al. Abnormal network activity in a targeted genetic model of human double cortex. J. Neurosci. 29, 313-27(2009).

30. Shoubridge, C., Cloosterman, D., Parkinson-Lawerence, E., Brooks, D. & Gecz, J. Molecular pathology of expanded polyalanine tract mutations in the Aristaless-related homeobox gene. Genomics 90, 59-71(2007).

II/ Conséquences de différentes mutations d'ARX sur la morphologie des interneurones.

Comme abordé dans l'introduction, des mutations du gène ARX engendrent des phénotypes plus ou moins drastiques et c'est ce qui rend l'étude de ce gène très intéressante. En effet, comment différentes mutations d'un même gène peuvent engendrer une telle hétérogénéité phénotypique ? Afin de comprendre les relations génotype-phénotype qui sous tendent ces différents syndromes chez l'homme, l'étude de l'effet des différentes mutations du gène ARX sur le développement cortical est donc nécessaire. Ces études pourraient ainsi permettre de clarifier les mécanismes générant ces altérations, et par la même occasion de comprendre plus précisément le rôle du gène ARX sur le développement cérébral.

Arx est majoritairement exprimé dans les neurones GABAergiques et il a été montré que des altérations du gène (surexpression ou inactivation) peuvent engendrer des anomalies de morphologie des interneurones en migration (Colombo et al., 2007; Friocourt et al., 2008). De plus, il semblerait que certains gènes nécessaires à la morphogenèse neuronale soient des cibles du gène ARX (Colasante et al., 2009; Fulp et al., 2008; Quillé et al., 2011). Nous avons émis l'hypothèse, compte tenu de l'hétérogénéité phénotypique des patients et de ces données, que les mutations d'ARX pourraient modifier de façon différente la morphologie des interneurones. Nous nous sommes ici intéressés à quatre mutations particulières du gène (voir partie introduction) qui engendrent des phénotypes distincts :

-(GCG)7, retrouvée majoritairement dans les syndromes de West et d'Ohtahara.

-P353L, retrouvée dans des cas de retards mentaux associés à une épilepsie myoclonique avec spasticité (XMESID) sans malformation cérébrale apparente.

-P353R, retrouvée dans le syndrome XLAG.

-Dup24, retrouvée dans les syndromes de Partington et de West mais aussi dans des cas de retards mentaux non syndromiques.

Par une collaboration avec le *Dr. G. Friocourt* (Brest, France), nous avons pu obtenir des constructions plasmidiques contenant ces différentes mutations adaptées au gène Arx de la souris. Nous avons ainsi pu réaliser des transfections sur notre modèle de culture de neurones primaires hippocampiques de rat (voir partie I des résultats) et analyser dans un premier temps les effets de ces mutations sur la morphologie des interneurones.

Afin d'évaluer l'impact des mutations du gène ARX par rapport à une forme non mutée du gène dans un cadre plus correct d'un point de vue génétique, nous avons cherché des

constructions des différentes mutations mais cette fois-ci sur la forme humaine du gène ARX. Nous avons pu obtenir les formes sauvage et ARX(GCG)7 humaines d'ARX par l'intermédiaire d'une collaboration avec le *Dr M. Pasqualetti* (Pise, Italie). Enfin, les formes humaines P353R et P353L ont pu être obtenues par l'intermédiaire d'une société (GenScript). Nous avons ainsi pu étudier, de façon plus exacte, les conséquences de ces mutations humaines sur la morphologie des interneurones *in vitro*, dans notre modèle de culture de neurones primaires de rat.

A. Les mutations du gène Arx Dup24 et P353R, adaptées chez la souris, engendrent un défaut de l'arborisation dendritique des interneurones *in vitro*.

Afin de voir si les différentes mutations d'Arx entrainent des modifications de la morphologie des interneurones, nous avons effectué des analyses in vitro. Pour cela, des cultures de neurones primaires de rat (E18) ont été transfectées à 3DIV avec nos différentes conditions : un plasmide contrôle exprimant la GFP ou nos constructions des différentes mutations du gène Arx adaptées au gène de la souris. 72 heures après transfection, des immunocytochimies ont été réalisées avec un anticorps spécifique de la GAD67 pour détecter les interneurones. Ainsi, nous avons mesuré la longueur des prolongements et le nombre de branchements de chaque interneurone transfecté avec nos différentes conditions. Etant donné la variabilité qu'il peut exister entre deux cultures neuronales, nos données ont chaque fois été normalisées par rapport à celles obtenues avec notre condition contrôle GFP (considéré comme 100%), pour une même culture. Dans un premier temps, nous avons comparé l'effet de nos mutations à la surexpression de la forme sauvage souris du gène Arx. Ainsi, nous avons montré que la mutation Dup24 diminue de façon significative (~37%) la longueur des prolongements dendritiques des interneurones comparé à la forme sauvage (Figure 1A). Nous avons aussi observé une diminution significative du nombre de branchements de l'arborisation des interneurones avec les mutations Dup24 (~50%) et P353R (~60%) comparée à la forme sauvage (Figure 1B, étoiles et barre noires). De façon intéressante, il existe des différences significatives entres les différentes mutations en ce qui concerne le nombre de branchements : celles qui donnent un effet identique à la forme sauvage ((GCG)7 et P353L) comparées à celles dont le nombre de branchement est diminué (Dup24 et P353R) (Figure 1B, étoiles et barres en couleur).



<u>Figure 1</u>: Effet des différentes mutations souris d'Arx sur l'arborisation dendritique des interneurones *in vitro*.

A. Quantification moyenne (en %) de la longueur dendritique totale des interneurones 72h après transfection d'un plasmide contrôle GFP, de la forme souris sauvage (wt) d'Arx, ou des différentes formes souris d'Arx mutées : (GCG)7, Dup24, P353L et P353R, sur des cultures de neurones primaires d'hippocampe de rat à 3DIV. La mutation Dup24 entraine une diminution significative de la longueur dendritique totale des interneurones comparée à la forme sauvage (t-test, P=0.036). **B**. Quantification moyenne (en %) du nombre de branchements dans des interneurones 72h après transfection d'un plasmide contrôle GFP, de la forme souris sauvage d'Arx, ou des différentes formes souris d'Arx mutées : (GCG)7, Dup24, P353L et P353R, sur des cultures de neurones primaires d'hippocampe de rat à 3DIV. Les mutations Dup24 et P353R entrainent une réduction significative du nombre de branchements des interneurones comparées à la forme sauvage (comparaison avec la forme sauvage (en noir) : Dup24, Mann & Whitney P=0.004 ; P353R, Mann & Whitney P≤0.001). La comparaison des mutations entre elles révèle également des différences significatives (comparaison de la forme (GCG)7 (en rouge) avec Dup24 : Mann & Whitney P=0.005, avec P353R : Mann & Whitney P=0.014 ; comparaison de la forme P353L (en bleu) et P353R : Mann & Whitney P=0.006).

Nous avons montré que les mutations Dup24 et P353R tendent à altérer de façon négative l'arborisation des interneurones. L'inactivation du gène Arx par l'intermédiaire de 3 ARNs interférents différents, transfectés sur culture de neurones primaires, entraine cependant une augmentation significative de la longueur des prolongements (**Figure 2A**) et du nombre des branchements (**Figure 2B**) des interneurones hippocampiques en culture.



<u>Figure 2</u> : L'inactivation d'ARX avec trois ARNs interférents différents entraine une augmentation de l'arborisation dendritique des interneurones *in vitro*.

A. Quantification moyenne (en %) de la longueur dendritique totale des interneurones 72h après transfection d'ARNs interférents sur cultures de neurones primaires d'hippocampe de rat à 3DIV. L'effet de chaque ARN interférent (ShC, ShD, S2) est comparé à son contrôle mismatch associé (MismShC, MismShD et MismS2) considéré comme 100%. L'inactivation d'ARX par les 3 ARNs entraine une augmentation significative de la longueur des dendrites (ShC, Mann & Whitney test, P=0.005 ; ShD, Mann & Whitney test, P=0.004 ; S2, Mann & Whitney test, P=0.009). **B**. Quantification moyenne (en %) du nombre de branchements dans des interneurones 72h après transfection d'ARNs interférent (ShC, ShD, S2) est comparé à son contrôle mismatch associé (MismShD et MismS2) considéré comme 100%. L'inactivation d'ARX par les 3 ARNs entraine une augmentation significative de la longueur des dendrites (ShC, trest, P=0.009). **B**. Quantification moyenne (en %) du nombre de branchements dans des interneurones 72h après transfection d'ARNs interférent (ShC, ShD, S2) est comparé à son contrôle mismatch associé (MismShC, MismShD et MismS2) considéré comme 100%. L'inactivation d'ARX par les 3 ARNs entraine une augmentation significative du nombre de branchements des interneurones (ShC, t-test, P≤0.001 ; ShD, t-test, P=0.012 ; S2, Mann & Whitney test, P=0.01).

<u>B.</u> Les mutations humaines du gène ARX n'engendrent pas de localisation subcellulaire anormale de la protéine.

Dans la littérature, il a été montré que certaines mutations d'ARX, et notamment les expansions polyalanine, engendrent une localisation anormale de la protéine principalement dans des lignées de cellules et ceci pourrait modifier la fonction correcte de la protéine (Friocourt et al., 2006; Fullston et al., 2011; Nasrallah et al., 2004; Shoubridge et al., 2007). Nous avons voulu déterminer l'effet des mutations humaines dont nous disposons sur la localisation subcellulaire de la protéine et ceci spécifiquement dans les interneurones. Nous avons ainsi, de la même façon que précédemment, réalisé des immunocytochimies avec des anticorps dirigés contre la *GAD67* et *ARX* sur des cultures de neurones primaires d'hippocampe de rat préalablement transfectées avec les différentes formes mutées (**Figure 3**). Ces expériences ont révélé que quelque soit le type de mutation transfectée, la protéine *ARX* est exprimée normalement, de façon nucléaire dans les interneurones (**Figure 3**).



Figure 3 : Localisation nucléaire normale de la protéine *ARX* mutée dans les interneurones *in vitro*. (A-E) Immunocytochimies réalisées sur des cultures primaires d'hippocampe de rat pour la GAD67 (en rouge) et la protéine *ARX* (en cyan), 72h après transfection (à 3DIV) avec soit un vecteur contrôle GFP (A), la forme humaine sauvage d'ARX (B), la forme humaine d'ARX muté (GCG)7 (C), la forme humaine d'ARX muté P353L (D), ou la forme humaine d'ARX muté P353R (E). Les interneurones (en rouge) transfectés (en vert), expriment la protéine *ARX* de façon nucléaire (en cyan). Barres d'échelle : 50μm.

C. Conséquences des mutations ARX humaines sur l'arborisation dendritique des interneurones *in vitro*.

Afin de confirmer nos résultats obtenus avec les mutations d'Arx adaptées au gène de la souris, nous avons réalisé le même type d'expériences sur des cultures de neurones primaires de rat mais cette fois ci avec les mutations humaines d'ARX. Comme montré dans la partie I des résultats, la forme humaine (GCG7) n'a aucun effet sur l'arborisation dendritique des interneurones (**Figure 4**).



<u>Figure 4</u> : Les formes humaines du gène ARX sauvage ou muté avec la mutation (GCG)7 n'ont pas d'effet sur l'arborisation dendritique des interneurones *in vitro*.

A. Quantification moyenne (en %) de la longueur dendritique totale des interneurones 72h après transfection d'un plasmide contrôle GFP, de la forme sauvage d'ARX humaine, ou de la forme humaine d'ARX muté (GCG)7 sur culture primaire d'hippocampe de rat à 3DIV. Aucune différence significative n'est observée entre les différentes conditions. **B**. Quantification moyenne (en %) du nombre de branchements des interneurones 72h après transfection d'un plasmide contrôle GFP, de la forme sauvage d'ARX humaine, ou de la forme humaine d'ARX muté (GCG)7 sur culture primaire d'hippocampe de rat à 3DIV. Aucune différence significative n'est observée entre les différentes conditions.

Ces résultats sont donc similaires avec ceux obtenus avec la mutation (GCG)7 adaptée au gène de la souris. Des transfections de cultures de neurones primaires de rat avec les mutations humaines P353R et P353L ont été réalisées et des analyses sont actuellement en cours afin de déterminer leur effet sur l'arborisation des interneurones et de corroborer ou non ces données avec les effets obtenus par les transfections des mutations souris. Nous pourrons ainsi établir des comparaisons sur l'effet des différentes mutations sur l'arborisation dendritique des interneurones.

D. Conclusion.

Ces expériences ont permis de montrer que:

i) Les mutations humaines du gène ARX n'entrainent pas une localisation anormale de la protéine dans les interneurones y compris la forme (GCG)7. Il a pourtant été montré que des transfections de cette mutation entrainent des anomalies de localisation subcellulaire de la protéine Arx dans des lignées de cellules (Friocourt et al., 2006; Fullston et al., 2011; Nasrallah et al., 2004; Shoubridge et al., 2007). Cette différence avec nos données pourrait être expliquée par le fait que les lignées de cellules utilisées dans la littérature n'expriment pas le gène Arx de façon endogène. Ainsi, la transfection de la mutation (GCG)7, dans ce type de lignées, va entrainer l'expression d'une protéine normalement absente, ce qui pourrait engendrer des anomalies de localisation de la protéine. Nos expériences sont ainsi réalisées dans un contexte plus relevant d'un point de vue cytologique puisque les interneurones, contrairement aux lignées cellulaires, expriment la protéine Arx de façon endogène et donc « connaissent » cette protéine. Les études réalisées sur les deux modèles de souris knock-in pour la mutation (GCG)7 n'ont pas mis en évidence de telles inclusions nucléaires (Kitamura et al., 2009; Price et al., 2009), bien que l'équipe de Price a reporté que la protéine ARX est localisée de façon cytoplasmique dans certains neurones corticaux des souris mutantes (Price et al., 2009). Ainsi, une localisation anormale de la protéine ne semble pas être la cause des phénotypes observés.

ii) Les quatre mutations du gène Arx adaptées au gène de la souris ont un impact différent sur l'arborisation dendritique des interneurones. En effet, les mutations Dup24 et P353R semblent avoir un impact négatif sur l'arborisation des interneurones *in vitro*, contrairement à l'inactivation du gène, qui elle, engendre une augmentation de l'arborisation dendritique. Etant donné que le gène Arx est un facteur de transcription qui peut influencer l'expression de nombreuses protéines, il est tout à fait possible d'imaginer que les mutations Dup24 et P353R ont un impact négatif et plus important sur la fonctionnalité de la protéine qui pourrait ainsi altérer la transcription de gènes nécessaires à la morphologie des interneurones. Bien que difficiles à interpréter, nos données corroborent, au moins pour la mutation P353R, avec les données préliminaires de notre collaboratrice G. Friocourt qui a mesuré la capacité de répression des différentes protéines mutées par l'utilisation d'un gène rapporteur (**Figure 5**). Elle a en effet montré que cette mutation diminue fortement la capacité de la protéine Arx à

réprimer l'expression du gène rapporteur luciférase dont l'activité reste de 100% suite à la transfection de la mutation P353R (**Figure 5**). Son étude sur l'activité transcriptionnelle de la protéine Arx en fonction de nombreuses mutations différentes suggère que la gravité des phénotypes observés chez l'homme semble corréler à l'effet des mutations sur l'activité transcriptionnelle, puisque les mutations retrouvées dans le syndrome le plus sévère (XLAG) ont une capacité de répression plus fortement diminuée (**Figure 5**).



<u>Figure 5 :</u> Mesure de l'activité luciférase, utilisée comme rapporteur de l'activité transcriptionnelle des différentes mutations souris d'Arx.

Les différentes constructions d'Arx ont été clonées dans un plasmide luciférase (utilisée comme rapporteur de l'activité transcriptionnelle) de la même façon que l'équipe de *Fulp et al.* en 2008, ainsi l'activité luciférase rapporte directement l'activité répressive de transcription des différentes constructions d'Arx. Les différentes constructions d'Arx ont été transfectées dans des cellules Neuro2a et l'activité luciférase a été mesurée. Les données de la luciférase ont été normalisées avec l'expression de la Renilla. Les données sont représentées en pourcentage d'activité comparé à un vecteur vide contrôle. La gravité du phénotype semble corrélée à l'effet des mutations sur l'activité transcriptionnelle d'ARX, puisque les mutations retrouvées dans le syndrome XLAG, le plus sévère, semblent diminuer la capacité d'Arx à réprimer l'expression du gène rapporteur qui reste exprimé à 100% pour la mutation P353R. (Données non publiées de notre collaboratrice : Dr G. Friocourt).

Les analyses sur les expériences réalisées avec les différentes mutations humaines nous permettront de corroborer ou non l'ensemble de ces résultats, et de préciser un peu plus les relations génotype-phénotype qui peuvent exister entre les différentes mutations du gène.

E. Méthodes.

Immunocytochimies, cultures primaires, transfections et analyses.

Les méthodes utilisées pour ces expériences sont identiques à celles de la partie I des résultats de ce manuscrit.

Constructions plasmidiques.

Nous avions, au début de ma thèse, crée deux ARNs interférents différents (ShC et ShD), avec leur contrôle mismatch associé (MismShC et MismShD) dans le but d'inactiver le gène Arx. Voici leurs différentes séquences :

ShC: 5'-CACCACTCAAGACCAAATGGAAA-3'

ShD: 5' - GACTGTTGAAGTCACCAAACTGT - 3'

MismShC: 5' - CACCACTCGATAACAAATCGAAA - 3'

MismShd: 5' - GACTGTCGACGGCACGAAACTGT - 3'

Ces deux ShRNAs, dirigés contre la partie 3'UTR du gène ARX ont été clonés de la même façon que le ShRNA (S2) (voir méthodes partie I des résultats). Malgré tous nos efforts, ces ShRNAs n'ont pu être validés à ce jour étant donné la difficulté de trouver une lignée cellulaire exprimant de façon stable et intense Arx, et de nos possibilités d'expérimentations au sein du laboratoire. Cependant, leurs effets semblent identiques au ShRNA (S2) publié par l'équipe du *Dr. Friocourt* en 2008, suggérant ainsi une bonne efficacité d'inactivation du gène.

Les différentes constructions des formes souris sauvages et mutées du gène Arx, clonées dans le vecteur pCAGIG (Addgene), ont été obtenues par l'intermédiaire de notre collaboratrice, le *Dr. G. Friocourt.*

Les formes humaines d'ARX mutées, P353L et P353R, ont été générées par GenScript (860 Centennial Ave.Piscataway, NJ 08854, USA), puis clonées dans le vecteur pCAGIG (Addgene).

DISCUSSION

Au cours de ce travail, nous avons étudié les conséquences physiopathologiques des mutations du gène ARX dans le développement cortical. L'analyse spécifique des effets de la mutation (GCG)7 a permis de mettre en évidence plusieurs point importants : i) cette mutation n'engendre pas de défauts de migration des neurones glutamatergiques ou GABAergiques, ii) la morphologie des interneurones in vitro et in vivo n'est pas affectée par cette altération du gène, iii) les épilepsies observées chez les souris knock-in pour cette mutation semblent résulter plutôt d'une réorganisation du réseau glutamatergique qu'à un défaut du réseau inhibiteur. Ces résultats suggèrent que les pathologies associées à la mutation (GCG)7 semblent distinctes des interneuronopathies liées à ARX. Nos travaux réalisés avec différentes mutations du gène ARX ont également mis en évidence que certaines altérations du gène sont associées à des anomalies morphologiques des interneurones. En effet, les mutations P353R et Dup24 semblent altérer la morphologie des interneurones en culture contrairement aux mutations (GCG)7 et P353L qui n'ont aucun effet. Ceci souligne donc la nécessité d'étudier l'effet des différentes mutations de façon spécifique, dans le but de clarifier plus précisément les liens génotype phénotype existant pour les différentes pathologies. D'une façon plus générale, l'ensemble de ces travaux souligne ainsi l'importance du rôle du gène ARX dans le développement cérébral et son implication complexe par sa diversité de mutations dans les différents désordres neurologiques.

I/ ARX et interneuronopathie.

De nombreuses études sur des modèles animaux ont montré que le gène ARX est nécessaire à la migration des interneurones (Colasante et al., 2008; Colombo et al., 2007; Friocourt et al., 2008; Kitamura et al., 2002). Compte tenu de ces observations et de la perte d'interneurones retrouvée chez les patients atteints du syndrome XLAG, il a été proposé le terme d'interneuronopathie pour décrire les pathologies liées aux mutations du gène ARX (Kato and Dobyns, 2005). *Kato & Dobyns* propose en effet que la perte d'interneurones est la conséquence d'un défaut de migration des neurones GABAergiques, et que cette absence aboutit aux épilepsies observées. Les études réalisées sur différents modèles murins déficients pour le gène ont en effet montré que l'absence du gène entraine des anomalies de la migration et de distribution des interneurones (Colombo et al., 2007; Kitamura et al., 2002). L'étude

d'une souris knock-in pour la mutation P353R, (retrouvée dans le syndrome XLAG) qui semblerait être une mutation perte de fonction, aboutit également à des anomalies de migration (Kitamura et al., 2009). Les expériences d'électroporation *ex vivo* dans les éminences ganglionnaires de tranches organotypiques réalisées par le *Dr Friocourt* ont également montré que l'inactivation du gène, par interférence ARN, altère la migration des neurones GABAergiques (Friocourt et al., 2008). Enfin, nos résultats après transfection *in utero*, dans les éminences ganglionnaires, de plusieurs ARNs interférents du gène ARX, montrent que la migration des interneurones vers le cortex est fortement perturbée. Ainsi, il est clair que le gène ARX est nécessaire à la migration des interneurones. De plus, les observations d'un changement de comportement migratoire des neurones pyramidaux après surexpression du gène ARX (de nombreux neurones transfectés adoptent un mode de migration tangentiel, voir partie I Résultats) soulignent encore davantage le rôle d'ARX dans la migration tangentielle. Ces travaux sont donc en accord avec le terme d'interneuronopathie proposé par *Kato & Dobyns* bien que l'origine de ces anomalies de migration reste encore inexpliquée.

On pourrait émettre l'hypothèse que ce gène, étant un facteur de transcription, agirait sur l'expression de différentes protéines nécessaires à la migration des interneurones telles que :

 i) <u>d'autres facteurs de transcription</u>: il a par exemple était montré que le gène Arx réprime l'expression du gène Ebf3, un facteur de transcription dont la répression est nécessaire à la migration tangentielle des interneurones (Colasante et al., 2009; Fulp et al., 2008).

ii) <u>des protéines nécessaires à la régulation du cytosquelette</u> : d'autres types de lissencéphalies sont en effet liées à des mutations de gènes nécessaires au cytosquelette tels que DCX ou Lis1 (pour revue voir (Friocourt et al., 2011)), le gène ARX pourrait avoir pour cible des gènes impliqués dans la régulation du cytosquelette. Cette idée est également renforcée par nos expériences d'inactivation du gène *in vitro* où nous avons montré que l'inactivation du gène entraine une augmentation de l'arborisation dendritique des interneurones (voir partie II résultats). Cette modification de morphologie pourrait être en effet liée à un défaut d'expression de protéines du cytosquelette.

iii) <u>des protéines nécessaires au guidage des neurones GABAergiques</u> : deux équipes ont montré par exemple que le transcrit du gène CXCR4, codant pour un récepteur des *Chémokines*, est diminué dans le subpallium des souris déficientes pour le gène ARX (Colasante et al., 2009; Fulp et al., 2008). Ainsi, un défaut dans la réception de molécules de guidage pourrait expliquer une anomalie de migration tangentielle.

Des études ultérieures devraient permettre de clarifier l'origine des anomalies de migration des neurones GABAergiques suite à une déficience du gène ARX.

Nous avons cependant montré ici que la mutation (GCG)7 n'altère pas la migration des neurones GABAergiques. Ces données ne sont donc pas réellement en accord avec le terme interneuronopathie proposé par *Kato & Dobyns*, mais sont concordantes avec les travaux réalisés par l'équipe du *Dr Kitamura*, en 2009, sur la lignée de souris transgéniques pour cette mutation. Ils ont en effet croisé ces souris knock-in avec des souris glutamate décarboxylase (GAD67-GFP) hétérozygotes, permettant la visualisation des interneurones en migration en période embryonnaire par la fluorescence GFP et ont montré que la mutation entraine seulement des défauts mineurs et transitoires de la migration des neurones GABAergiques (Kitamura et al., 2009).

L'absence d'anomalie de migration des interneurones suite à la transfection in utero de la forme mutée d'ARX (GCG)7 est en accord avec nos analyses histochimiques de la distribution des interneurones réalisées sur la lignée de souris du Dr Kitamura. En effet, nous n'avons observé aucune différence significative dans la distribution de différents sous types d'interneurones (calbindine, parvalbumine, calrétinine) du cortex et de l'hippocampe des souris knock-in pour la mutation (GCG)7 comparée à des souris sauvages. Ceci renforce l'idée que cette mutation n'altère pas la mise en place des interneurones dans le cortex cérébral. Ces données ne sont pourtant pas totalement identiques à celles retrouvées par l'équipe du Dr Kitamura, qui a montré que ces souris présentent une faible diminution (~13%) de cellules exprimant la GAD67 et d'environ 20% des interneurones positifs pour la parvalbumine. Ceci pourrait être expliqué par le fait qu'ils ont analysé un faible nombre d'animaux (n=3) comparé à nos travaux (n=12) (Kitamura et al., 2009). De la même façon, l'équipe de Dr Price, en 2009, a analysé un autre modèle de souris transgéniques pour la mutation (GCG)7 chez lequel ils ont montré une réduction sélective des interneurones positifs pour la calbindine (Price et al., 2009). Cette différence pourrait être expliquée par le fond génétique qui est mixte (N2) chez les souris du groupe de Price. En effet, il est actuellement proposé que le fond génétique des souris peut influencer le phénotype, notamment dans les désordres neurologiques (Frankel, 2009).

L'expression maintenue d'*ARX* dans les neurones GABAergiques pendant la différenciation et même chez l'adulte suggèrent un rôle de ce gène dans la maturation et la fonction des interneurones. En effet, nous avons montré que la morphologie des interneurones en culture est perturbée suite à des altérations du gène ARX. Nos travaux ont montré que l'inactivation du gène par interférence ARN entraine une augmentation significative de la longueur des prolongements et du nombre de branchements des interneurones (voir partie II

Résultats). Ces données sont en accord avec les résultats obtenus par l'équipe de *Colombo* en 2007 qui montrent, sur des cultures d'explants, une augmentation du nombre de branchements des interneurones d'éminence ganglionnaire médiane de souris déficientes pour le gène ARX (Colombo et al., 2007). Cependant, la mutation (GCG)7 n'affecte pas la maturation dendritique des neurones GABAergiques puisque ni la longueur, ni les ramifications dendritiques des interneurones transfectés avec cette construction ne sont altérées (voir partie I et II Résultats). L'analyse des interneurones hippocampiques des souris knock-in pour la mutation (GCG)7 injectées avec de la biocytine a montré des résultats similaires (voir partie I Résultats).

Enfin, nos expériences réalisées sur des tranches aigues d'hippocampe de souris knock-in pour la mutation (GCG)7 n'ont révélé aucune anomalie au niveau des courants post synaptiques inhibiteurs spontanés, dont la fréquence et l'amplitude sont similaires à celles enregistrées sur des souris sauvages issues de la même portée. Ces observations suggèrent ainsi une fonctionnalité correcte des interneurones hippocampiques mutés. Des expériences supplémentaires, notamment des enregistrements des propriétés intrinsèques des interneurones de ces souris knock-in, seront tout de même nécessaires pour confirmer ces données.

Nos résultats suggèrent que l'origine des épilepsies liées à la mutation (GCG)7 n'est pas associée à des défauts des neurones GABAergiques. Nous proposons ainsi de réviser le terme « interneuronopathie » en parlant des pathologies liées aux mutations du gène ARX et de mieux faire la distinction entre les mutations conduisant à des pertes d'interneurones, qui semblent plutôt correspondre à des pertes de fonctions du gène, de celles n'altérant pas la maturation morpho-fonctionnelle des interneurones, mutations qui semblent plutôt correspondre aux expansions polyalanine. Il est aussi intéressant de souligner la bonne correspondance existant entre altération de migration des interneurones et malformation corticale qui permet d'établir un lien entre migration des neurones GABAergiques et lissencéphalie. Des travaux ultérieurs sont cependant nécessaires pour comprendre : i) à quel niveau le gène ARX agit sur la mise en place des interneurones, ii) pourquoi certaines mutations engendrent seulement des défauts de migration tangentielle. Il est donc nécessaire de mieux identifier les cibles du gène ARX, ce que les études actuellement disponibles n'ont que très partiellement élucidé.

II/ ARX et neurones glutamatergiques.

Bien que la plupart des études suggèrent que les anomalies observées chez les patients résultent d'un défaut au niveau des interneurones, certaines études montrent que ce gène peut aussi avoir un rôle dans la mise en place des cellules pyramidales. En effet, l'étude post mortem de cerveaux de patients atteints du syndrome XLAG et de souris déficientes pour le gène ARX ont montré des anomalies de la lamination corticale (Kitamura et al., 2002; Okazaki et al., 2008). Ceci a suggéré que le gène ARX pouvait avoir un rôle également dans la migration radiaire des neurones glutamatergiques. Les travaux de *Friocourt* en 2008 (Friocourt et al., 2008) et nos travaux (voir partie I résultats), par électroporation *in utero* ont en effet suggéré que les altérations du gène ARX entrainent des anomalies de migration radiaire. Cependant, le gène ARX n'est pas exprimé dans les neurones glutamatergiques en migration mais seulement dans la zone ventriculaire progénitrice corticale (Friocourt et al., 2004)(voir aussi partie I résultats).

Ceci amène alors deux hypothèses : i) ARX aurait un rôle dans la prolifération cellulaire plutôt que dans la migration elle-même, et/ou, ii) la diminution de l'expression d'Arx est nécessaire à l'entrée des neurones dans la plaque corticale.

i) ARX aurait un rôle dans la prolifération cellulaire plutôt que dans la migration radiaire. Cette première hypothèse est en accord avec les analyses du cycle cellulaire des progéniteurs de la zone ventriculaire corticale réalisées par Friocourt et al., en 2008, montrant que la surexpression du gène ARX augmente la longueur du cycle cellulaire alors que l'inactivation du gène ARX tend à la diminuer (Friocourt et al., 2008). De plus, des études réalisées, par exemple, sur des souris mutantes pour le gène Nde1 (codant pour une protéine nécessaire à l'organisation des microtubules et interagissant directement avec la protéine Lis1) ont montré que des défauts de prolifération des progéniteurs neuronaux (arrêt de mitose ou changement d'orientation du fuseau mitotique) peuvent être à l'origine d'un défaut de lamination du cortex cérébral (diminution de l'épaisseur corticale) (Feng and Walsh, 2004). Il a de plus été montré que la répression de certains gènes dans la zone progénitrice corticale est nécessaire à la sortie du cycle cellulaire, et indirectement à la migration des jeunes neurones. Parmi ces gènes, Le gène RTP801, codant pour une protéine inhibitrice de la voie mTOR influence à la fois la prolifération et la migration neuronale (Malagelada et al., 2011). Il a été montré que son expression est forte dans les progéniteurs corticaux et devient de plus en plus réduite au fur et à mesure de la maturation des neurones. Des inactivations in vitro et in vivo ont montré que l'absence de ce gène accélère la sortie du cycle cellulaire et augmente la différenciation des neurones (Malagelada et al., 2011). Son inactivation entraine un défaut de migration des jeunes neurones pyramidaux chez le rat et provoque une localisation ectopique de neurones matures (Malagelada et al., 2011). Nous proposons donc que les défauts de migration des neurones pyramidaux observés suite à des altérations du gène ARX résulteraient plutôt d'un défaut de prolifération des progéniteurs neuronaux que d'une altération du mouvement migratoire.

ii) <u>La diminution de l'expression d'*Arx* est nécessaire à l'entrée des neurones dans la plaque corticale</u>. Cette deuxième hypothèse et soutenue par les observations des altérations de la migration des cellules pyramidales après surexpression du gène ARX. En effet, chez les rats ou souris chez lesquels la forme sauvage du gène ARX est électroporée *in utero*, le maintien de l'expression d'ARX, dans les neurones glutamatergiques, pendant la phase de migration est associé à un arrêt de la migration radiaire et l'adoption dans certains cas d'un mode de migration tangentielle (voir partie I Résultats et (Friocourt et al., 2008)). En d'autres termes, l'expression ectopique d'ARX dans les neurones pyramidaux en migration entraine un arrêt de migration, suggérant qu'une diminution du gène est nécessaire pour la migration correcte des neurones glutamatergiques dans la plaque corticale.

L'analyse des souris knock-in pour la mutation (GCG)7 montrent d'autre part que cette mutation n'altère pas la migration des neurones pyramidaux ni la lamination corticale, confirmant une fois encore que cette mutation n'altère pas la construction corticale. Ceci est en accord avec les observations cliniques radiologiques montant que chez les patients le cortex est normal d'un point de vue architectural.

Il serait cependant intéressant de réaliser des études plus poussées afin de clarifier le rôle du gène ARX dans la prolifération des neurones glutamatergiques corticaux et de définir les gènes régulateurs en aval d'ARX dans la zone ventriculaire corticale. Ces études permettraient de comprendre les mécanismes pouvant entrainer des anomalies de lamination corticale dans les cas de perte de fonction du gène.

III/ ARX et hétérogénéité phénotypique.

Comme évoqué dans l'introduction, le gène ARX est un gène complexe, de par son implication dans de nombreux processus cellulaires au cours du développement, et de par la diversité de phénotypes associée à ses mutations. En effet, comment des altérations d'un gène impliqué dans de nombreux processus développementaux tels que le développement des muscles squelettiques, du pancréas, de l'appareil génital ou du système nerveux n'engendrent majoritairement que des pathologies neurologiques ? Ceci souligne l'importance capitale du gène ARX pour le développement du système nerveux central, et son implication dans les désordres neurologiques semble très complexe. En effet, comment des mutations dans un même gène ARX peuvent engendrer des phénotypes allant de retards mentaux « simples » à des pathologies très sévères avec des malformations cérébrales ?

Il n'y a actuellement pas de réelles explications concernant l'hétérogénéité phénotypique liée aux mutations du gène ARX. Les analyses génotype phénotype des patients ont seulement mis en évidence que les mutations touchant l'homéodomaine (qui est un domaine très conservé) tendent à engendrer les phénotypes les plus sévères avec malformation cérébrale et anomalie génitale et que les expansions polyalanine semblent entrainer des phénotypes plus modérés de retards mentaux associés ou non à des épilepsies, sans malformation cérébrale apparente.

J'ai abordé au cours de ma thèse cette question en comparant d'abord le phénotype obtenu par l'inactivation du gène avec celui produit par l'expansion du premier domaine polyalanine, ce qui a fait déjà l'objet de discussion dans les chapitres précédents. De plus j'ai évalué l'impact que des mutations différentes du gène pouvaient avoir : i) sur la localisation subcellulaire de la protéine dans les interneurones, ii) sur la maturation dendritique des interneurones.

i) Impact des mutations sur la localisation subcellulaire de la protéine. Alors que la littérature suggère que les mutations du gène ARX peuvent engendrer des inclusions intranucléaires de la protéine, pouvant entrainer un défaut de fonctionnalité, notamment pour les expansions polyalanine (Friocourt et al., 2006; Nasrallah et al., 2004; Shoubridge et al., 2007), aucune des mutations exprimées dans les interneurones de nos cultures n'aboutissent à un tel phénomène. Ces études précédentes ont été réalisées sur des lignées de cellules, qui n'expriment pas le gène ARX de façon endogène. Ainsi, la transfection de la mutation (GCG)7, dans ce type de lignées, va entrainer l'expression d'une protéine normalement absente, ce qui pourrait engendrer des anomalies de localisation de la protéine. Au contraire, nos expériences sont réalisées dans un contexte plus pertinent d'un point de vue cytologique puisque les interneurones, contrairement aux lignées cellulaires, expriment la protéine *Arx* de façon endogène. Il semblerait donc que des défauts de fonctionnalité liés à une localisation anormale de la protéine suite aux mutations du gène ne soient pas la cause des phénotypes observés.

ii) <u>Impact des mutations sur la maturation dendritique des interneurones.</u> De façon intéressante, les mutations Dup24 et P353R, adaptées chez la souris, entrainent une

diminution significative des ramifications dendritiques des interneurones en culture, alors que les mutations P353L et (GCG)7 n'ont aucun effet sur la morphologie de ces neurones GABAergiques. Ces résultats devront être validés avec des formes humaines de ces mutations, qui permettront de mieux établir un lien entre génotype et phénotype.

La complexité phénotypique liée au gène ARX n'est pas un cas isolé puisque qu'il existe de nombreux gènes dont les mutations donnent des phénotypes variés.

Des mutations du gène MECP2 (Methyl CpG binding protein-2) par exemple, peuvent engendrer un large spectre de désordres neurologiques développementaux tels que le syndrome de Rett, les encéphalopahies néonatales, les retards mentaux et de l'autisme (Gonzales and LaSalle, 2010). De façon surprenante, il peut même exister des différences phénotypiques intrafamiliales pour une même mutation. Une différence intrafamiliale est retrouvée par exemple pour une même mutation du gène MAPT (une protéine associée aux microtubules) qui aboutit à des symptômes différents (démences, symptômes parkinsonien, maladie d'Alzheimer) dans les membres d'une même famille (Larner, 2009).

Ces complexités phénotypiques observées suite à des mutations d'un gène ne sont pas restreintes qu'au système nerveux central. Des mutations du gène Nkx2.5, codant pour un facteur de transcription exprimé dans le cœur, aboutissent à des maladies cardiaques dans lesquelles on retrouve plusieurs types de malformations du cœur (Benson et al., 1999; Stallmeyer et al., 2010). L'étude des mécanismes entrainant de telles hétérogénéités phénotypiques suite à des mutations d'un même gène apparait donc capitale pour comprendre pourquoi de telles mutations peuvent engendrer un large spectre de pathologies.

Le gène ARX est ainsi un bon candidat pour l'étude de la complexité des liens génotype phénotype qui peuvent exister dans la diversité des pathologies. Notre étude a permis de montrer des effets distincts pour chaque mutation. Nous avons en effet montré que ni la migration neuronale, ni la distribution des interneurones ne sont altérées par la mutation (GCG)7 (voir partie I Résultats), alors qu'il semblerait d'après la littérature que les mutations retrouvées dans l'homéodomaine altèrent ce processus (Kitamura et al., 2009; Okazaki et al., 2008). Ces données sont en accord avec les phénotypes observés chez les patients : en effet, les mutations dans l'homéodomaine entrainent généralement des malformations cérébrales (pouvant être liées à des anomalies de migration, voir Introduction) alors que les expansions polyalanine n'entrainent pas de malformation (d'où l'absence d'anomalie de migration observée) (Shoubridge et al., 2010). Nous avons également montré que la morphologie des interneurones en culture est altérée uniquement par certaines mutations du gène : la mutation

P353R et la mutation Dup24. On peut ainsi émettre l'hypothèse que ces mutations entrainent un mauvais fonctionnement de la protéine, notamment en altérant sa fonction de régulation de l'activité transcriptionnelle de gènes nécessaires au cytosquelette. L'activité transcriptionnelle du gène pourrait être modifiée de façon différente selon les mutations, et c'est ce que suggèrent les résultats préliminaires de notre collaboratrice *G. Friocourt* qui a mesuré l'activité de répression du gène ARX. Il semblerait en effet que les mutations retrouvées dans les pathologies les plus sévères (syndrome XLAG) soient des mutations perte de fonction pour la protéine *Arx* (voir partie II Résultats), et que les mutations engendrant des pathologies plus « modérées » entrainent seulement une perte partielle de fonction.

Il serait intéressant d'étudier de façon spécifique l'effet de chaque mutation sur la mise en place du cerveau. Ces travaux permettraient de clarifier les mécanismes aboutissant à une telle variété de désordres neurologiques développementaux.

IV/ ARX, épilepsie et remaniement de réseau.

La majorité des mutations du gène ARX entraine des épilepsies chez l'Homme (Shoubridge et al., 2010), mais les mécanismes physiopathologiques restent encore à élucider. Les données de la littérature ainsi que celles obtenues dans ma thèse indiquent cependant que les différentes mutations du gène induisent des altérations morpho-fonctionnelles distinctes. Il n'y a vraisemblablement pas un mécanisme unique et la compréhension de l'épileptogenèse liée aux mutations du gène ARX nécessitera d'étudier chaque mutation séparément.

Les modèles murins knock-out pour le gène Arx n'ont pu mettre en évidence de telles crises d'épilepsie puisque ces animaux meurent très précocement après la naissance (Colombo et al., 2007; Kitamura et al., 2002). Le modèle de souris déficientes pour le gène ARX, de façon spécifique aux interneurones, généré par *Marsh et al.*, en 2009, a été le premier modèle de souris déficientes pour le gène ARX présentant des épilepsies. Ces souris, en effet, ont des crises qui débutent très tôt après la naissance et présentent une sémiologie comparable aux spasmes infantiles de l'enfant, aussi bien au niveau comportemental qu'au niveau électroencéphalographique (Marsh et al., 2009). Un peu plus tard, deux équipes ont généré plusieurs modèles de souris knock-in pour des mutations d'ARX. Ainsi, il a été montré que les souris knock-in pour les mutations P353L et (GCG)7 présentent des épisodes épileptiformes (Kitamura et al., 2009; Price et al., 2009). Il semblerait que la mutation (GCG)7 donne le phénotype le plus drastique comparée à la mutation P353L (Kitamura et al., 2009). Ces souris semblent être de très bons modèles pour étudier les épilepsies liées aux

altérations du gène ARX, cependant, aucune étude à ce jour n'a été réalisée pour clarifier réellement l'origine de ces épilepsies.

Nous avons eu la chance d'obtenir la lignée de souris knock-in pour la mutation (GCG)7 du Dr Kitamura (Kitamura et al., 2009). Nous avons confirmé que ces souris ne semblent pas avoir d'anomalie de mise en place des interneurones (voir partie I Résultats). Pourtant ces souris présentent des épilepsies sévères dont le foyer serait situé dans l'hippocampe (Kitamura et al., 2009). Afin de clarifier plus précisément les mécanismes sous tendant ces épilepsies, nous avons réalisé des enregistrements électrophysiologiques sur des tranches aigues d'hippocampe préparées à partir de ces souris. Nous avons montré que les courants post synaptiques inhibiteurs ne sont pas altérés par cette mutation en corrélation parfaite avec les données morphologiques n'illustrant ni une perte, ni une modification cytoarchitecturale des interneurones. Ceci suggère que l'épilepsie liée à cette mutation ne rentre pas dans la catégorie des interneuronopathies à proprement parler. En effet, ces dernières sont normalement liées à des défauts de fonctionnalité du réseau GABAergique comme c'est le cas par exemple pour les mutations du gène SCN1A, retrouvées dans des épilepsies myocloniques sévères infantiles (syndrome de Dravet) (Yu et al., 2006). Cette équipe a montré que les souris hétérozygotes pour le gène Scn1A, codant pour un canal sodique voltage dépendant, développent des épilepsies spontanées. Une diminution des courants sodiques spécifiquement dans les interneurones est observée chez ces souris (Yu et al., 2006). Il a été proposé que ce défaut au niveau des interneurones entraine une augmentation de l'excitabilité corticale globale (Mullen and Scheffer, 2009; Yu et al., 2006). Pour confirmer notre hypothèse concernant l'impact de la mutation (GCG)7, des enregistrements des propriétés intrinsèques des interneurones sont prévus afin de confirmer que, chez les souris knock-in pour la mutation (GCG)7, l'activité des interneurones n'est pas altérée. Il serait intéressant d'étudier l'action du neurotransmetteur GABA, au cours du développement, chez les modèles de souris knock-in pour les mutations du gène ARX en se focalisant plus particulièrement sur la période de transition excitation/inhibition du GABA (Ben-Ari et al., 1990; Ben-Ari, 2002; Cherubini et al., 1990; Owens and Kriegstein, 2002). De telles études permettraient d'évaluer si un problème au niveau de la fonctionnalité GABAergique peut jouer un rôle dans l'apparition des crises d'épilepsie.

Les enregistrements réalisés sur tranches aigues d'hippocampe de souris knock-in pour la mutation (GCG)7 montrent des décharges épileptiformes spontanées en l'absence d'agent convulsivant (Voir partie I des résultats), ce qui souligne le caractère épileptogène du tissu suite à la mutation (GCG)7. Nous avons observé une augmentation significative des courants post synaptiques excitateurs dans l'hippocampe de ces souris (voir partie I Résultats) ce qui suggère que l'excitabilité hippocampique serait liée à une augmentation de l'activité glutamatergique, entrainant un défaut subséquent de la balance excitation/inhibition. Un cas similaire a été rapporté chez des souris déficientes pour le gène Lgi1, mutation retrouvée dans des pathologies associant épilepsie et problèmes auditifs. Chez ces souris, la transmission synaptique inhibitrice n'est pas perturbée mais il apparait une augmentation de la transmission synaptique excitatrice liée à une augmentation de la libération du glutamate (Yu et al., 2010). De la même façon, l'inactivation du gène DCX par électroporation *in utero* chez le rat, entrainant une hétérotopie en bande, conduit à une altération du réseau glutamatergique du cortex adjacent à l'hétérotopie et cela en absence d'anomalie des signaux GABAergiques (Ackman et al., 2009).

Afin d'évaluer si le réseau glutamatergique hippocampique était altéré chez les souris knock-in pour la mutation (GCG)7, nous avons étudié la morphologie des cellules pyramidales de l'hippocampe dans la zone CA1. Nous avons montré que ces cellules présentent des anomalies morphologiques importantes. En effet, environ 50% de ces cellules ont des fibres axonales récurrentes qui projettent de façon ectopique dans l'hippocampe (voir partie I Résultats). Nous proposons que ces récurrentes excitatrices pourraient contribuer à l'épileptogenèse en augmentant les entrées glutamatergiques et/ou en facilitant la synchronisation cellulaire à l'origine des décharges hyper-synchrones caractérisant les activités épileptiques. Des remodelages similaires du réseau axonal ont été décrits dans l'hippocampe de rats épileptiques adultes (modèle d'épilepsie temporale induit par le traitement à la pilocarpine ou à l'acide kaïnique), et il a été proposé que ces remodelages pouvaient contribuer au phénotype épileptique (Esclapez et al., 1999; Lehmann et al., 2000). A ce jour, nous ne pouvons pas dire si cette réorganisation observée chez les souris knock-in pour la mutation (GCG)7 est la cause ou la conséquence des crises d'épilepsie. Cependant leur présence à des stades relativement précoces du développement (P15) laisse plutôt penser à une altération développementale.

Etant donné que les neurones pyramidaux n'expriment pas le gène ARX, nous proposons que les altérations morpho-fonctionnelles des neurones glutamatergiques observées chez les souris knock-in pour la mutation (GCG)7 seraient secondaires à la mutation initiale affectant primairement les interneurones. De même, l'épilepsie observée chez les souris

knock-in pour la mutation (GCG)7 serait une conséquence indirecte de la mutation. Des altérations secondaires liées à la perturbation d'un gène au cours du développement cortical peuvent en effet avoir lieu. *Ackman et al.*, en 2009, ont par exemple montré que, chez un modèle de rat d'hétérotopie en bande, des altérations du réseau glutamatergique apparaissent dans la malformation elle-même, mais également dans le cortex dit « normal » (là où il n'y a pas l'hétérotopie). Ainsi, les épilepsies observées chez les souris knock-in pour la mutation (GCG)7 pourraient être la conséquence d'un remaniement du réseau neuronal suite à la mutation initiale du gène. Des études ultérieures nous permettront de clarifier cet aspect. Enfin, il serait intéressant d'évaluer si des mécanismes similaires opèrent dans d'autres modèles de souris knock-in pour les mutations du gène ARX voire même dans d'autres formes d'épilepsie.

CONCLUSION

Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié les conséquences des mutations du gène ARX dans le développement cérébral. Nous avons mis en évidence que la mutation (GCG)7 ne semble pas être à l'origine d'une interneuronopathie puisque que la mise en place des neurones GABAergiques ainsi que la fonctionnalité du réseau inhibiteur ne semblent pas être altérés suite à cette mutation. Il semblerait que des altérations du réseau glutamatergique, secondaires à la mutation initiale, soient responsables des épilepsies observées. Nos analyses de différentes mutations du gène ARX ont montré que ces mutations ont des effets différents sur la morphologie des interneurones. Ceci est à l'image de la grande variabilité phénotypique retrouvée chez les patients et implique l'existence de mécanismes d'action distincts pour chaque mutation. L'ensemble de ces données souligne l'importance du gène ARX dans la mise en place du cortex cérébral et la nécessité d'approfondir les analyses génotype phénotype. Des expériences futures permettront de clarifier l'origine des épilepsies liées à ARX et de mieux comprendre ce type de pathologies dans le but d'améliorer le traitement des crises associées, souvent très invalidantes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Absoud, M., Parr, J.R, Halliday, D, Pretorius, P, Zaiwalla, Z Jayawant, S (2010) A novel ARX phenotype: rapid neurodegeneration with Ohtahara syndrome and a dyskinetic movement disorder. Dev Med Child Neurol 52:305-307.
- Ackman, J.B., Aniksztejn, L, Crépel, V, Becq, H, Pellegrino, C, Cardoso, C, Ben-Ari, Y Represa, A (2009) Abnormal network activity in a targeted genetic model of human double cortex. J Neurosci 29:313-327.
- Adams, N.C., Tomoda, T, Cooper, M, Dietz, G Hatten, M.E (2002) Mice that lack astrotactin have slowed neuronal migration. Development 129:965-972.
- Albrecht, A. Mundlos, S (2005) The other trinucleotide repeat: polyalanine expansion disorders. Curr Opin Genet Dev 15:285-293.
- Aligianis, I.A., Johnson, C.A, Gissen, P, Chen, D, Hampshire, D, Hoffmann, K, Maina, E.N, Morgan, N.V, Tee, L, Morton, J, Ainsworth, J.R, Horn, D, Rosser, E, Cole, T.R.P, Stolte-Dijkstra, I, Fieggen, K, Clayton-Smith, J, Mégarbané, A, Shield, J.P, Newbury-Ecob, R, Dobyns, W.B, Graham, J.M.J, Kjaer, K.W, Warburg, M, Bond, J, Trembath, R.C, Harris, L.W, Takai, Y, Mundlos, S, Tannahill, D, Woods, C.G Maher, E.R (2005) Mutations of the catalytic subunit of RAB3GAP cause Warburg Micro syndrome. Nat Genet 37:221-223.
- Alvarez-Buylla, A. Lim, D.A (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. Neuron 41:683-686.
- Anderson, S.A., Marín, O, Horn, C, Jennings, K Rubenstein, J.L (2001) Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. Development 128:353-363.
- Andrade, D.M. (2009) Genetic basis in epilepsies caused by malformations of cortical development and in those with structurally normal brain. Hum Genet 126:173-193.
- Ang, E.S.B.C.J., Haydar, T.F, Gluncic, V Rakic, P (2003) Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. J Neurosci 23:5805-5815.

- Angevine, J.B.J. Sidman, R.L (1961) Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. Nature 192:766-768.
- Anton, E.S., Marchionni, M.A, Lee, K.F Rakic, P (1997) Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. Development 124:3501-3510.
- Anton, E.S., Kreidberg, J.A Rakic, P (1999) Distinct functions of alpha3 and alpha(v) integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. Neuron 22:277-289.
- Aronica, E., Gorter, J.A, Jansen, G.H, van Veelen, C.W.M, van Rijen, P.C, Ramkema, M Troost, D (2003) Expression and cell distribution of group I and group II metabotropic glutamate receptor subtypes in taylor-type focal cortical dysplasia. Epilepsia 44:785-795.
- Ayala, R., Shu, T Tsai, L (2007) Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. Cell 128:29-43.
- Baala, L., Briault, S, Etchevers, H.C, Laumonnier, F, Natiq, A, Amiel, J, Boddaert, N, Picard, C, Sbiti, A, Asermouh, A, Attié-Bitach, T, Encha-Razavi, F, Munnich, A, Sefiani, A Lyonnet, S (2007)
 Homozygous silencing of T-box transcription factor EOMES leads to microcephaly with polymicrogyria and corpus callosum agenesis. Nat Genet 39:454-456.
- Bai, J., Ramos, R.L, Ackman, J.B, Thomas, A.M, Lee, R.V LoTurco, J.J (2003) RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. Nat Neurosci 6:1277-1283.

Barkovich, A.J. (2010) Current concepts of polymicrogyria. Neuroradiology 52:479-487.

- Batista-Brito, R. Fishell, G (2009) The developmental integration of cortical interneurons into a functional network. Curr Top Dev Biol 87:81-118.
- Bayer, S.A., Altman, J, Russo, R.J, Dai, X.F Simmons, J.A (1991) Cell migration in the rat embryonic neocortex. J Comp Neurol 307:499-516.
- Becker, A.J., Urbach, H, Scheffler, B, Baden, T, Normann, S, Lahl, R, Pannek, H.W, Tuxhorn, I, Elger, C.E, Schramm, J, Wiestler, O.D Blümcke, I (2002) Focal cortical dysplasia of Taylor's balloon cell

type: mutational analysis of the TSC1 gene indicates a pathogenic relationship to tuberous sclerosis. Ann Neurol 52:29-37.

- Bellion, A., Baudoin, J, Alvarez, C, Bornens, M Métin, C (2005) Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. J Neurosci 25:5691-5699.
- Ben-Ari, Y., Rovira, C, Gaiarsa, J.L, Corradetti, R, Robain, O Cherubini, E (1990) GABAergic mechanisms in the CA3 hippocampal region during early postnatal life. Prog Brain Res 83:313-321.
- Ben-Ari, Y. (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. Nat Rev Neurosci 3:728-739.
- Benson, D.W., Silberbach, G.M, Kavanaugh-McHugh, A, Cottrill, C, Zhang, Y, Riggs, S, Smalls, O, Johnson, M.C, Watson, M.S, Seidman, J.G, Seidman, C.E, Plowden, J Kugler, J.D (1999) Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. J Clin Invest 104:1567-1573.
- Bhat, S.S., Rogers, R.C, Holden, K.R Srivastava, A.K (2005) A novel in-frame deletion in ARX is associated with lissencephaly with absent corpus callosum and hypoplastic genitalia. Am J Med Genet A 138:70-72.
- Bienvenu, T., Poirier, K, Friocourt, G, Bahi, N, Beaumont, D, Fauchereau, F, Ben Jeema, L, Zemni, R,
 Vinet, M, Francis, F, Couvert, P, Gomot, M, Moraine, C, van Bokhoven, H, Kalscheuer, V, Frints, S,
 Gecz, J, Ohzaki, K, Chaabouni, H, Fryns, J, Desportes, V, Beldjord, C Chelly, J (2002) ARX, a novel
 Prd-class-homeobox gene highly expressed in the telencephalon, is mutated in X-linked mental
 retardation. Hum Mol Genet 11:981-991.
- Biressi, S., Messina, G, Collombat, P, Tagliafico, E, Monteverde, S, Benedetti, L, Cusella De Angelis,M.G, Mansouri, A, Ferrari, S, Tajbakhsh, S, Broccoli, V Cossu, G (2008) The homeobox gene Arx is a novel positive regulator of embryonic myogenesis. Cell Death Differ 15:94-104.
- Blümcke, I., Thom, M, Aronica, E, Armstrong, D.D, Vinters, H.V, Palmini, A, Jacques, T.S, Avanzini, G,
 Barkovich, A.J, Battaglia, G, Becker, A, Cepeda, C, Cendes, F, Colombo, N, Crino, P, Cross, J.H,
 Delalande, O, Dubeau, F, Duncan, J, Guerrini, R, Kahane, P, Mathern, G, Najm, I, Ozkara, C,
 Raybaud, C, Represa, A, Roper, S.N, Salamon, N, Schulze-Bonhage, A, Tassi, L, Vezzani, A Spreafico,

R (2011) The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. Epilepsia 52:158-174.

- Bonneau, D., Toutain, A, Laquerriere, A, Marret, S, Saugier-Veber, P, Barthez, M, Radi, S, Biran-Mucignat, V, Rodriguez, D Gelot, A (2002) X-linked lissencephaly with absent corpus callosum and ambiguous genitalia (XLAG): clinical, magnetic resonance imaging, and neuropathological findings. Ann Neurol 51:340-349.
- Brennan, J. Capel, B (2004) One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. Nat Rev Genet 5:509-521.
- Brooks, A.S., Bertoli-Avella, A.M, Burzynski, G.M, Breedveld, G.J, Osinga, J, Boven, L.G, Hurst, J.A, Mancini, G.M.S, Lequin, M.H, de Coo, R.F, Matera, I, de Graaff, E, Meijers, C, Willems, P.J, Tibboel, D, Oostra, B.A Hofstra, R.M.W (2005) Homozygous nonsense mutations in KIAA1279 are associated with malformations of the central and enteric nervous systems. Am J Hum Genet 77:120-126.
- Brown, L.Y. Brown, S.A (2004) Alanine tracts: the expanding story of human illness and trinucleotide repeats. Trends Genet 20:51-58.
- Brown, K.N., Chen, S, Han, Z, Lu, C, Tan, X, Zhang, X, Ding, L, Lopez-Cruz, A, Saur, D, Anderson, S.A, Huang, K Shi, S (2011) Clonal production and organization of inhibitory interneurons in the neocortex. Science 334:480-486.
- Brunelli, S., Faiella, A, Capra, V, Nigro, V, Simeone, A, Cama, A Boncinelli, E (1996) Germline mutations in the homeobox gene EMX2 in patients with severe schizencephaly. Nat Genet 12:94-96.
- Bruyere, H., Lewis, S, Wood, S, MacLeod, P.J Langlois, S (1999) Confirmation of linkage in X-linked infantile spasms (West syndrome) and refinement of the disease locus to Xp21.3-Xp22.1. Clin Genet 55:173-181.
- Butt, S.J.B., Fuccillo, M, Nery, S, Noctor, S, Kriegstein, A, Corbin, J.G Fishell, G (2005) The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. Neuron 48:591-604.
- Cardoso, C., Leventer, R.J, Dowling, J.J, Ward, H.L, Chung, J, Petras, K.S, Roseberry, J.A, Weiss, A.M, Das, S, Martin, C.L, Pilz, D.T, Dobyns, W.B Ledbetter, D.H (2002) Clinical and molecular basis of classical lissencephaly: Mutations in the LIS1 gene (PAFAH1B1). Hum Mutat 19:4-15.
- Cepeda, C., André, V.M, Yamazaki, I, Hauptman, J.S, Chen, J.Y, Vinters, H.V, Mathern, G.W Levine, M.S (2010) Comparative study of cellular and synaptic abnormalities in brain tissue samples from pediatric tuberous sclerosis complex and cortical dysplasia type II. Epilepsia 51 Suppl 3:160-165.
- Chang, B.S., Duzcan, F, Kim, S, Cinbis, M, Aggarwal, A, Apse, K.A, Ozdel, O, Atmaca, M, Zencir, S, Bagci, H Walsh, C.A (2007) The role of RELN in lissencephaly and neuropsychiatric disease. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 144B:58-63.
- Cherubini, E., Rovira, C, Gaiarsa, J.L, Corradetti, R Ben Ari, Y (1990) GABA mediated excitation in immature rat CA3 hippocampal neurons. Int J Dev Neurosci 8:481-490.
- Claes, S., Devriendt, K, Lagae, L, Ceulemans, B, Dom, L, Casaer, P, Raeymaekers, P, Cassiman, J.J Fryns, J.P (1997) The X-linked infantile spasms syndrome (MIM 308350) maps to Xp11.4-Xpter in two pedigrees. Ann Neurol 42:360-364.
- Colasante, G., Collombat, P, Raimondi, V, Bonanomi, D, Ferrai, C, Maira, M, Yoshikawa, K, Mansouri, A, Valtorta, F, Rubenstein, J.L.R Broccoli, V (2008) Arx is a direct target of Dlx2 and thereby contributes to the tangential migration of GABAergic interneurons. J Neurosci 28:10674-10686.
- Colasante, G., Sessa, A, Crispi, S, Calogero, R, Mansouri, A, Collombat, P Broccoli, V (2009) Arx acts as a regional key selector gene in the ventral telencephalon mainly through its transcriptional repression activity. Dev Biol 334:59-71.
- Collombat, P., Mansouri, A, Hecksher-Sorensen, J, Serup, P, Krull, J, Gradwohl, G Gruss, P (2003) Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. Genes Dev 17:2591-2603.
- Collombat, P., Hecksher-Sorensen, J, Broccoli, V, Krull, J, Ponte, I, Mundiger, T, Smith, J, Gruss, P, Serup, P Mansouri, A (2005) The simultaneous loss of Arx and Pax4 genes promotes a somatostatin-producing cell fate specification at the expense of the alpha- and beta-cell lineages in the mouse endocrine pancreas. Development 132:2969-2980.

- Collombat, P., Hecksher-Sorensen, J, Krull, J, Berger, J, Riedel, D, Herrera, P.L, Serup, P Mansouri, A (2007) Embryonic endocrine pancreas and mature beta cells acquire alpha and PP cell phenotypes upon Arx misexpression. J Clin Invest 117:961-970.
- Colombo, E., Galli, R, Cossu, G, Gecz, J Broccoli, V (2004) Mouse orthologue of ARX, a gene mutated in several X-linked forms of mental retardation and epilepsy, is a marker of adult neural stem cells and forebrain GABAergic neurons. Dev Dyn 231:631-639.
- Colombo, E., Collombat, P, Colasante, G, Bianchi, M, Long, J, Mansouri, A, Rubenstein, J.L.R Broccoli, V (2007) Inactivation of Arx, the murine ortholog of the X-linked lissencephaly with ambiguous genitalia gene, leads to severe disorganization of the ventral telencephalon with impaired neuronal migration and differentiation. J Neurosci 27:4786-4798.
- Colombo, N., Tassi, L, Galli, C, Citterio, A, Lo Russo, G, Scialfa, G Spreafico, R (2003) Focal cortical dysplasias: MR imaging, histopathologic, and clinical correlations in surgically treated patients with epilepsy. AJNR Am J Neuroradiol 24:724-733.
- Conti, V., Marini, C, Gana, S, Sudi, J, Dobyns, W.B Guerrini, R (2011) Corpus callosum agenesis, severe mental retardation, epilepsy, and dyskinetic quadriparesis due to a novel mutation in the homeodomain of ARX. Am J Med Genet A 155A:892-897.
- Cossee, M., Faivre, L, Philippe, C, Hichri, H, de Saint-Martin, A, Laugel, V, Bahi-Buisson, N, Lemaitre, J, Leheup, B, Delobel, B, Demeer, B, Poirier, K, Biancalana, V, Pinoit, J, Julia, S, Chelly, J, Devys, D Mandel, J (2011) ARX polyalanine expansions are highly implicated in familial cases of mental retardation with infantile epilepsy and/or hand dystonia. Am J Med Genet A 155A:98-105.
- Crino, P.B., Duhaime, A.C, Baltuch, G White, R (2001) Differential expression of glutamate and GABA-A receptor subunit mRNA in cortical dysplasia. Neurology 56:906-913.
- Cummings, C.J. Zoghbi, H.Y (2000) Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. Hum Mol Genet 9:909-916.
- D'Arcangelo, G. (2006) Reelin mouse mutants as models of cortical development disorders. Epilepsy Behav 8:81-90.

- De Arcangelis, A., Mark, M, Kreidberg, J, Sorokin, L Georges-Labouesse, E (1999) Synergistic activities of alpha3 and alpha6 integrins are required during apical ectodermal ridge formation and organogenesis in the mouse. Development 126:3957-3968.
- Dhawan, S., Georgia, S, Tschen, S, Fan, G Bhushan, A (2011) Pancreatic beta cell identity is maintained by DNA methylation-mediated repression of Arx. Dev Cell 20:419-429.
- Dobyns, W.B., Berry-Kravis, E, Havernick, N.J, Holden, K.R Viskochil, D (1999) X-linked lissencephaly with absent corpus callosum and ambiguous genitalia. Am J Med Genet 86:331-337.
- Ekşioğlu, Y.Z., Pong, A.W Takeoka, M (2011) A novel mutation in the aristaless domain of the ARX gene leads to Ohtahara syndrome, global developmental delay, and ambiguous genitalia in males and neuropsychiatric disorders in females. Epilepsia 52:984-992.
- El-Hodiri, H.M., Qi, X Seufert, D.W (2003) The Xenopus arx gene is expressed in the developing rostral forebrain. Dev Genes Evol 212:608-612.
- Elias, L.A.B., Wang, D.D Kriegstein, A.R (2007) Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. Nature 448:901-907.
- Esclapez, M., Hirsch, J.C, Ben-Ari, Y Bernard, C (1999) Newly formed excitatory pathways provide a substrate for hyperexcitability in experimental temporal lobe epilepsy. J Comp Neurol 408:449-460.
- Feng, Y. Walsh, C.A (2004) Mitotic spindle regulation by Nde1 controls cerebral cortical size. Neuron 44:279-293.
- Ferland, R.J., Batiz, L.F, Neal, J, Lian, G, Bundock, E, Lu, J, Hsiao, Y, Diamond, R, Mei, D, Banham, A.H,
 Brown, P.J, Vanderburg, C.R, Joseph, J, Hecht, J.L, Folkerth, R, Guerrini, R, Walsh, C.A, Rodriguez,
 E.M Sheen, V.L (2009) Disruption of neural progenitors along the ventricular and subventricular zones in periventricular heterotopia. Hum Mol Genet 18:497-516.
- Finkelstein, R. Boncinelli, E (1994) From fly head to mammalian forebrain: the story of otd and Otx. Trends Genet 10:310-315.

- Flames, N., Long, J.E, Garratt, A.N, Fischer, T.M, Gassmann, M, Birchmeier, C, Lai, C, Rubenstein, J.L.R Marín, O (2004) Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. Neuron 44:251-261.
- Fox, J.W., Lamperti, E.D, Ekşioğlu, Y.Z, Hong, S.E, Feng, Y, Graham, D.A, Scheffer, I.E, Dobyns, W.B, Hirsch, B.A, Radtke, R.A, Berkovic, S.F, Huttenlocher, P.R Walsh, C.A (1998) Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. Neuron 21:1315-1325.
- Francis, F., Koulakoff, A, Boucher, D, Chafey, P, Schaar, B, Vinet, M.C, Friocourt, G, McDonnell, N, Reiner, O, Kahn, A, McConnell, S.K, Berwald-Netter, Y, Denoulet, P Chelly, J (1999) Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. Neuron 23:247-256.
- Frankel, W.N. (2009) Genetics of complex neurological disease: challenges and opportunities for modeling epilepsy in mice and rats. Trends Genet 25:361-367.
- Friocourt, G., Poirier, K, Rakic, S, Parnavelas, J.G Chelly, J (2006) The role of ARX in cortical development. Eur J Neurosci 23:869-876.
- Friocourt, G., Kanatani, S, Tabata, H, Yozu, M, Takahashi, T, Antypa, M, Raguenes, O, Chelly, J, Ferec,C, Nakajima, K Parnavelas, J.G (2008) Cell-autonomous roles of ARX in cell proliferation and neuronal migration during corticogenesis. J Neurosci 28:5794-5805.
- Friocourt, G. Parnavelas, J.G (2010) Mutations in ARX Result in Several Defects Involving GABAergic Neurons. Front Cell Neurosci 4:4.
- Friocourt, G., Marcorelles, P, Saugier-Veber, P, Quille, M, Marret, S Laquerriere, A (2011) Role of cytoskeletal abnormalities in the neuropathology and pathophysiology of type I lissencephaly. Acta Neuropathol 121:149-170.
- Fullenkamp, A.N. El-Hodiri, H.M (2008) The function of the Aristaless-related homeobox (Arx) gene product as a transcriptional repressor is diminished by mutations associated with X-linked mental retardation (XLMR). Biochem Biophys Res Commun 377:73-78.

- Fullston, T., Brueton, L, Willis, T, Philip, S, MacPherson, L, Finnis, M, Gecz, J Morton, J (2010) Ohtahara syndrome in a family with an ARX protein truncation mutation (c.81C>G/p.Y27X). Eur J Hum Genet 18:157-162.
- Fullston, T., Finnis, M, Hackett, A, Hodgson, B, Brueton, L, Baynam, G, Norman, A, Reish, O, Shoubridge, C Gecz, J (2011) Screening and cell-based assessment of mutations in the Aristalessrelated homeobox (ARX) gene. Clin Genet :.
- Fulp, C.T., Cho, G, Marsh, E.D, Nasrallah, I.M, Labosky, P.A Golden, J.A (2008) Identification of Arx transcriptional targets in the developing basal forebrain. Hum Mol Genet 17:3740-3760.
- Gambello, M.J., Darling, D.L, Yingling, J, Tanaka, T, Gleeson, J.G Wynshaw-Boris, A (2003) Multiple dose-dependent effects of Lis1 on cerebral cortical development. J Neurosci 23:1719-1729.
- Gécz, J., Cloosterman, D Partington, M (2006) ARX: a gene for all seasons. Curr Opin Genet Dev 16:308-316.
- Gécz, J., Shoubridge, C Corbett, M (2009) The genetic landscape of intellectual disability arising from chromosome X. Trends Genet 25:308-316.
- Gelman, D.M., Martini, F.J, Nóbrega-Pereira, S, Pierani, A, Kessaris, N Marín, O (2009) The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons. J Neurosci 29:9380-9389.
- Gelman, D.M. Marín, O (2010) Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex. Eur J Neurosci 31:2136-2141.
- Georges-Labouesse, E., Mark, M, Messaddeq, N Gansmüller, A (1998) Essential role of alpha 6 integrins in cortical and retinal lamination. Curr Biol 8:983-986.
- Giordano, L., Sartori, S, Russo, S, Accorsi, P, Galli, J, Tiberti, A, Bettella, E, Marchi, M, Vignoli, A, Darra,F, Murgia, A Bernardina, B.D (2010) Familial Ohtahara syndrome due to a novel ARX gene mutation. Am J Med Genet A 152A:3133-3137.
- Glaser, T., Jepeal, L, Edwards, J.G, Young, S.R, Favor, J Maas, R.L (1994) PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. Nat Genet 7:463-471.

- Gleeson, J.G., Lin, P.T, Flanagan, L.A Walsh, C.A (1999) Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. Neuron 23:257-271.
- Gonzales, M.L. LaSalle, J.M (2010) The role of MeCP2 in brain development and neurodevelopmental disorders. Curr Psychiatry Rep 12:127-134.
- Grajkowska, W., Kotulska, K, Matyja, E, Larysz-Brysz, M, Mandera, M, Roszkowski, M, Domańska-Pakieła, D, Lewik-Kowalik, J Jóźwiak, S (2008) Expression of tuberin and hamartin in tuberous sclerosis complex-associated and sporadic cortical dysplasia of Taylor's balloon cell type. Folia Neuropathol 46:43-48.
- Granata, R., Baragli, A, Settanni, F, Scarlatti, F Ghigo, E (2010) Unraveling the role of the ghrelin gene peptides in the endocrine pancreas. J Mol Endocrinol 45:107-118.
- Granata, T., Farina, L, Faiella, A, Cardini, R, D'Incerti, L, Boncinelli, E Battaglia, G (1997) Familial schizencephaly associated with EMX2 mutation. Neurology 48:1403-1406.
- Granata, T., Freri, E, Caccia, C, Setola, V, Taroni, F Battaglia, G (2005) Schizencephaly: clinical spectrum, epilepsy, and pathogenesis. J Child Neurol 20:313-318.
- Graus-Porta, D., Blaess, S, Senften, M, Littlewood-Evans, A, Damsky, C, Huang, Z, Orban, P, Klein, R, Schittny, J.C Müller, U (2001) Beta1-class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. Neuron 31:367-379.
- Greenwood, J.S.F., Wang, Y, Estrada, R.C, Ackerman, L, Ohara, P.T Baraban, S.C (2009) Seizures, enhanced excitation, and increased vesicle number in Lis1 mutant mice. Ann Neurol 66:644-653.
- Grønskov, K., Hjalgrim, H, Nielsen, I Brøndum-Nielsen, K (2004) Screening of the ARX gene in 682 retarded males. Eur J Hum Genet 12:701-705.
- Guerrini, R. Filippi, T (2005) Neuronal migration disorders, genetics, and epileptogenesis. J Child Neurol 20:287-299.

- Guerrini, R., Moro, F, Kato, M, Barkovich, A.J, Shiihara, T, McShane, M.A, Hurst, J, Loi, M, Tohyama, J, Norci, V, Hayasaka, K, Kang, U.J, Das, S Dobyns, W.B (2007) Expansion of the first PolyA tract of ARX causes infantile spasms and status dystonicus. Neurology 69:427-433.
- Guerrini, R., Dobyns, W.B Barkovich, A.J (2008) Abnormal development of the human cerebral cortex: genetics, functional consequences and treatment options. Trends Neurosci 31:154-162.

Guerrini, R. Parrini, E (2010) Neuronal migration disorders. Neurobiol Dis 38:154-166.

- Gumbinger, C., Rohsbach, C.B, Schulze-Bonhage, A, Korinthenberg, R, Zentner, J, Häffner, M Fauser, S (2009) Focal cortical dysplasia: a genotype-phenotype analysis of polymorphisms and mutations in the TSC genes. Epilepsia 50:1396-1408.
- Gupta, A., Tsai, L Wynshaw-Boris, A (2002) Life is a journey: a genetic look at neocortical development. Nat Rev Genet 3:342-355.
- Han, K. Manley, J.L (1993) Functional domains of the Drosophila Engrailed protein. EMBO J 12:2723-2733.
- Haubensak, W., Attardo, A, Denk, W Huttner, W.B (2004) Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 101:3196-3201.
- Heng, J.I., Nguyen, L, Castro, D.S, Zimmer, C, Wildner, H, Armant, O, Skowronska-Krawczyk, D,
 Bedogni, F, Matter, J, Hevner, R Guillemot, F (2008) Neurogenin 2 controls cortical neuron
 migration through regulation of Rnd2. Nature 455:114-118.
- Hernández-Miranda, L.R., Parnavelas, J.G Chiara, F (2010) Molecules and mechanisms involved in the generation and migration of cortical interneurons. ASN Neuro 2:e00031.
- Hirotsune, S., Fleck, M.W, Gambello, M.J, Bix, G.J, Chen, A, Clark, G.D, Ledbetter, D.H, McBain, C.J
 Wynshaw-Boris, A (1998) Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal
 migration defects and early embryonic lethality. Nat Genet 19:333-339.

- Hong, S.E., Shugart, Y.Y, Huang, D.T, Shahwan, S.A, Grant, P.E, Hourihane, J.O, Martin, N.D Walsh, C.A (2000) Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. Nat Genet 26:93-96.
- Itoh, M., Takizawa, Y, Hanai, S, Okazaki, S, Miyata, R, Inoue, T, Akashi, T, Hayashi, M Goto, Y (2010) Partial loss of pancreas endocrine and exocrine cells of human ARX-null mutation: consideration of pancreas differentiation. Differentiation 80:118-122.
- Jaglin, X.H., Poirier, K, Saillour, Y, Buhler, E, Tian, G, Bahi-Buisson, N, Fallet-Bianco, C, Phan-Dinh-Tuy,
 F, Kong, X.P, Bomont, P, Castelnau-Ptakhine, L, Odent, S, Loget, P, Kossorotoff, M, Snoeck, I,
 Plessis, G, Parent, P, Beldjord, C, Cardoso, C, Represa, A, Flint, J, Keays, D.A, Cowan, N.J Chelly, J
 (2009) Mutations in the beta-tubulin gene TUBB2B result in asymmetrical polymicrogyria. Nat
 Genet 41:746-752.
- Jansen, A.C., Oostra, A, Desprechins, B, De Vlaeminck, Y, Verhelst, H, Régal, L, Verloo, P, Bockaert, N, Keymolen, K, Seneca, S, De Meirleir, L Lissens, W (2011) TUBA1A mutations: from isolated lissencephaly to familial polymicrogyria. Neurology 76:988-992.
- Johansson, K.A. Grapin-Botton, A (2002) Development and diseases of the pancreas. Clin Genet 62:14-23.
- Kappeler, C., Saillour, Y, Baudoin, J, Tuy, F.P.D, Alvarez, C, Houbron, C, Gaspar, P, Hamard, G, Chelly, J,
 Métin, C Francis, F (2006) Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived
 from doublecortin knockout mice. Hum Mol Genet 15:1387-1400.
- Kato, M., Das, S, Petras, K, Sawaishi, Y Dobyns, W.B (2003) Polyalanine expansion of ARX associated with cryptogenic West syndrome. Neurology 61:267-276.
- Kato, M. Dobyns, W.B (2003) Lissencephaly and the molecular basis of neuronal migration. Hum Mol Genet 12 Spec No 1:R89-96.
- Kato, M., Das, S, Petras, K, Kitamura, K, Morohashi, K, Abuelo, D.N, Barr, M, Bonneau, D, Brady, A.F,
 Carpenter, N.J, Cipero, K.L, Frisone, F, Fukuda, T, Guerrini, R, Iida, E, Itoh, M, Lewanda, A.F, Nanba,
 Y, Oka, A, Proud, V.K, Saugier-Veber, P, Schelley, S.L, Selicorni, A, Shaner, R, Silengo, M, Stewart, F,
 Sugiyama, N, Toyama, J, Toutain, A, Vargas, A.L, Yanazawa, M, Zackai, E.H Dobyns, W.B (2004)

Mutations of ARX are associated with striking pleiotropy and consistent genotype-phenotype correlation. Hum Mutat 23:147-159.

- Kato, M. Dobyns, W.B (2005) X-linked lissencephaly with abnormal genitalia as a tangential migration disorder causing intractable epilepsy: proposal for a new term, "interneuronopathy". J Child Neurol 20:392-397.
- Kawauchi, T., Chihama, K, Nabeshima, Y Hoshino, M (2006) Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27kip1 contributing to actin organization and cortical neuronal migration. Nat Cell Biol 8:17-26.
- Kitamura, K., Yanazawa, M, Sugiyama, N, Miura, H, Iizuka-Kogo, A, Kusaka, M, Omichi, K, Suzuki, R, Kato-Fukui, Y, Kamiirisa, K, Matsuo, M, Kamijo, S, Kasahara, M, Yoshioka, H, Ogata, T, Fukuda, T, Kondo, I, Kato, M, Dobyns, W.B, Yokoyama, M Morohashi, K (2002) Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. Nat Genet 32:359-369.
- Kitamura, K., Itou, Y, Yanazawa, M, Ohsawa, M, Suzuki-Migishima, R, Umeki, Y, Hohjoh, H, Yanagawa,
 Y, Shinba, T, Itoh, M, Nakamura, K Goto, Y (2009) Three human ARX mutations cause the
 lissencephaly-like and mental retardation with epilepsy-like pleiotropic phenotypes in mice. Hum
 Mol Genet 18:3708-3724.
- Kliemann, S.E., Waetge, R.T.L, Suzuki, O.T, Passos-Bueno, M.R Rosemberg, S (2003) Evidence of neuronal migration disorders in Knobloch syndrome: clinical and molecular analysis of two novel families. Am J Med Genet A 119A:15-19.
- Kordowich, S., Collombat, P, Mansouri, A Serup, P (2011) Arx and Nkx2.2 compound deficiency redirects pancreatic alpha- and beta-cell differentiation to a somatostatin/ghrelin co-expressing cell lineage. BMC Dev Biol 11:52.
- Kriegstein, A.R. Noctor, S.C (2004) Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. Trends Neurosci 27:392-399.
- Kriegstein, A. Alvarez-Buylla, A (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. Annu Rev Neurosci 32:149-184.

- Larner, A.J. (2009) Intrafamilial clinical phenotypic heterogeneity with MAPT gene splice site IVS10+16C>T mutation. J Neurol Sci 287:253-256.
- Lehmann, T.N., Gabriel, S, Kovacs, R, Eilers, A, Kivi, A, Schulze, K, Lanksch, W.R, Meencke, H.J Heinemann, U (2000) Alterations of neuronal connectivity in area CA1 of hippocampal slices from temporal lobe epilepsy patients and from pilocarpine-treated epileptic rats. Epilepsia 41 Suppl 6:S190-4.
- Li, G., Adesnik, H, Li, J, Long, J, Nicoll, R.A, Rubenstein, J.L.R Pleasure, S.J (2008) Regional distribution of cortical interneurons and development of inhibitory tone are regulated by Cxcl12/Cxcr4 signaling. J Neurosci 28:1085-1098.
- Lin, W., Ye, W, Cai, L, Meng, X, Ke, G, Huang, C, Peng, Z, Yu, Y, Golden, J.A, Tartakoff, A.M Tao, T (2009) The roles of multiple importins for nuclear import of murine aristaless-related homeobox protein. J Biol Chem 284:20428-20439.
- Liu, J., Hunter, C.S, Du, A, Ediger, B, Walp, E, Murray, J, Stein, R May, C.L (2011) Islet-1 regulates Arx transcription during pancreatic islet alpha-cell development. J Biol Chem 286:15352-15360.
- Lois, C. Alvarez-Buylla, A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. Science 264:1145-1148.

Lu, J. Sheen, V (2005) Periventricular heterotopia. Epilepsy Behav 7:143-149.

- López-Bendito, G., Sánchez-Alcañiz, J.A, Pla, R, Borrell, V, Picó, E, Valdeolmillos, M Marín, O (2008) Chemokine signaling controls intracortical migration and final distribution of GABAergic interneurons. J Neurosci 28:1613-1624.
- Mailhos, C., André, S, Mollereau, B, Goriely, A, Hemmati-Brivanlou, A Desplan, C (1998) Drosophila Goosecoid requires a conserved heptapeptide for repression of paired-class homeoprotein activators. Development 125:937-947.
- Malagelada, C., López-Toledano, M.A, Willett, R.T, Jin, Z.H, Shelanski, M.L Greene, L.A (2011) RTP801/REDD1 regulates the timing of cortical neurogenesis and neuron migration. J Neurosci 31:3186-3196.

- Mamin, A. Philippe, J (2007) Activin A decreases glucagon and arx gene expression in alpha-cell lines. Mol Endocrinol 21:259-273.
- Marcorelles, P., Laquerriere, A, Adde-Michel, C, Marret, S, Saugier-Veber, P, Beldjord, C Friocourt, G (2010) Evidence for tangential migration disturbances in human lissencephaly resulting from a defect in LIS1, DCX and ARX genes. Acta Neuropathol 120:503-515.
- Marsh, E., Fulp, C, Gomez, E, Nasrallah, I, Minarcik, J, Sudi, J, Christian, S.L, Mancini, G, Labosky, P, Dobyns, W, Brooks-Kayal, A Golden, J.A (2009) Targeted loss of Arx results in a developmental epilepsy mouse model and recapitulates the human phenotype in heterozygous females. Brain 132:1563-1576.
- Martini, F.J., Valiente, M, López Bendito, G, Szabó, G, Moya, F, Valdeolmillos, M Marín, O (2009) Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. Development 136:41-50.
- Martini, F.J. Valdeolmillos, M (2010) Actomyosin contraction at the cell rear drives nuclear translocation in migrating cortical interneurons. J Neurosci 30:8660-8670.
- Marín, O. Rubenstein, J.L (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. Nat Rev Neurosci 2:780-790.
- Marín, O., Yaron, A, Bagri, A, Tessier-Lavigne, M Rubenstein, J.L (2001) Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. Science 293:872-875.

Marín, O. Rubenstein, J.L.R (2003) Cell migration in the forebrain. Annu Rev Neurosci 26:441-483.

- Mastracci, T., Wilcox, C, Panea, C, Golden, J, May, C Sussel, L (2011) Nkx2.2 and Arx genetically interact to regulate pancreatic endocrine cell development and endocrine hormone expression. Dev Biol :.
- McKenzie, O., Ponte, I, Mangelsdorf, M, Finnis, M, Colasante, G, Shoubridge, C, Stifani, S, Gecz, J Broccoli, V (2007) Aristaless-related homeobox gene, the gene responsible for West syndrome and related disorders, is a Groucho/transducin-like enhancer of split dependent transcriptional repressor. Neuroscience 146:236-247.

- Meijlink, F., Beverdam, A, Brouwer, A, Oosterveen, T.C Berge, D.T (1999) Vertebrate aristalessrelated genes. Int J Dev Biol 43:651-663.
- Melkman, T. Sengupta, P (2005) Regulation of chemosensory and GABAergic motor neuron development by the C. elegans Aristaless/Arx homolog alr-1. Development 132:1935-1949.
- Merello, E., Swanson, E, De Marco, P, Akhter, M, Striano, P, Rossi, A, Cama, A, Leventer, R.J, Guerrini, R, Capra, V Dobyns, W.B (2008) No major role for the EMX2 gene in schizencephaly. Am J Med Genet A 146A:1142-1150.
- Métin, C., Baudoin, J, Rakić, S Parnavelas, J.G (2006) Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. Eur J Neurosci 23:894-900.
- Ming, G. Song, H (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. Annu Rev Neurosci 28:223-250.
- Miura, H., Yanazawa, M, Kato, K Kitamura, K (1997) Expression of a novel aristaless related homeobox gene 'Arx' in the vertebrate telencephalon, diencephalon and floor plate. Mech Dev 65:99-109.
- Mullen, S.A. Scheffer, I.E (2009) Translational research in epilepsy genetics: sodium channels in man to interneuronopathy in mouse. Arch Neurol 66:21-26.
- Murtaugh, L.C. (2007) Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible. Development 134:427-438.
- Nadarajah, B., Brunstrom, J.E, Grutzendler, J, Wong, R.O Pearlman, A.L (2001) Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. Nat Neurosci 4:143-150.
- Nadarajah, B. Parnavelas, J.G (2002) Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. Nat Rev Neurosci 3:423-432.
- Nagano, T., Morikubo, S Sato, M (2004) Filamin A and FILIP (Filamin A-Interacting Protein) regulate cell polarity and motility in neocortical subventricular and intermediate zones during radial migration. J Neurosci 24:9648-9657.

- Najm, I.M., Tilelli, C.Q Oghlakian, R (2007) Pathophysiological mechanisms of focal cortical dysplasia: a critical review of human tissue studies and animal models. Epilepsia 48 Suppl 2:21-32.
- Nasrallah, I.M., Minarcik, J.C Golden, J.A (2004) A polyalanine tract expansion in Arx forms intranuclear inclusions and results in increased cell death. J Cell Biol 167:411-416.
- Nawara, M., Szczaluba, K, Poirier, K, Chrzanowska, K, Pilch, J, Bal, J, Chelly, J Mazurczak, T (2006) The ARX mutations: a frequent cause of X-linked mental retardation. Am J Med Genet A 140:727-732.
- Noctor, S.C., Flint, A.C, Weissman, T.A, Dammerman, R.S Kriegstein, A.R (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. Nature 409:714-720.
- Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V, Ivic, L Kriegstein, A.R (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. Nat Neurosci 7:136-144.
- Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V Kriegstein, A.R (2007) Contribution of intermediate progenitor cells to cortical histogenesis. Arch Neurol 64:639-642.
- Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V Kriegstein, A.R (2008) Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. J Comp Neurol 508:28-44.
- Ogata, T., Matsuo, N, Hiraoka, N Hata, J.I (2000) X-linked lissencephaly with ambiguous genitalia: delineation of further case. Am J Med Genet 94:174-176.
- Ohira, R., Zhang, Y.H, Guo, W, Dipple, K, Shih, S.L, Doerr, J, Huang, B.L, Fu, L.J, Abu-Khalil, A, Geschwind, D McCabe, E.R.B (2002) Human ARX gene: genomic characterization and expression. Mol Genet Metab 77:179-188.
- Okazaki, S., Ohsawa, M, Kuki, I, Kawawaki, H, Koriyama, T, Ri, S, Ichiba, H, Hai, E, Inoue, T, Nakamura, H, Goto, Y, Tomiwa, K, Yamano, T, Kitamura, K Itoh, M (2008) Aristaless-related homeobox gene disruption leads to abnormal distribution of GABAergic interneurons in human neocortex: evidence based on a case of X-linked lissencephaly with abnormal genitalia (XLAG). Acta Neuropathol 116:453-462.
- Owens, D.F. Kriegstein, A.R (2002) Is there more to GABA than synaptic inhibition?. Nat Rev Neurosci 3:715-727.

- Parrini, E., Ramazzotti, A, Dobyns, W.B, Mei, D, Moro, F, Veggiotti, P, Marini, C, Brilstra, E.H, Dalla Bernardina, B, Goodwin, L, Bodell, A, Jones, M.C, Nangeroni, M, Palmeri, S, Said, E, Sander, J.W, Striano, P, Takahashi, Y, Van Maldergem, L, Leonardi, G, Wright, M, Walsh, C.A Guerrini, R (2006) Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin A mutations. Brain 129:1892-1906.
- Patrylo, P.R., Browning, R.A Cranick, S (2006) Reeler homozygous mice exhibit enhanced susceptibility to epileptiform activity. Epilepsia 47:257-266.
- Patrylo, P.R. Willingham, A (2007) Anatomic and electrophysiologic evidence for a proconvulsive circuit in the dentate gyrus of reeler mutant mice, an animal model of diffuse cortical malformation. Dev Neurosci 29:73-83.
- Piao, X., Hill, R.S, Bodell, A, Chang, B.S, Basel-Vanagaite, L, Straussberg, R, Dobyns, W.B, Qasrawi, B, Winter, R.M, Innes, A.M, Voit, T, Ross, M.E, Michaud, J.L, Déscarie, J, Barkovich, A.J Walsh, C.A (2004) G protein-coupled receptor-dependent development of human frontal cortex. Science 303:2033-2036.
- Pinard, J.M., Motte, J, Chiron, C, Brian, R, Andermann, E Dulac, O (1994) Subcortical laminar heterotopia and lissencephaly in two families: a single X linked dominant gene. J Neurol Neurosurg Psychiatry 57:914-920.
- Poirier, K., Van Esch, H, Friocourt, G, Saillour, Y, Bahi, N, Backer, S, Souil, E, Castelnau-Ptakhine, L, Beldjord, C, Francis, F, Bienvenu, T Chelly, J (2004) Neuroanatomical distribution of ARX in brain and its localisation in GABAergic neurons. Brain Res Mol Brain Res 122:35-46.
- Poirier, K., Abriol, J, Souville, I, Laroche-Raynaud, C, Beldjord, C, Gilbert, B, Chelly, J Bienvenu, T (2005) Maternal mosaicism for mutations in the ARX gene in a family with X linked mental retardation. Hum Genet 118:45-48.
- Poirier, K., Lacombe, D, Gilbert-Dussardier, B, Raynaud, M, Desportes, V, de Brouwer, A.P.M, Moraine, C, Fryns, J.P, Ropers, H.H, Beldjord, C, Chelly, J Bienvenu, T (2006) Screening of ARX in mental retardation families: Consequences for the strategy of molecular diagnosis. Neurogenetics 7:39-46.

- Poirier, K., Keays, D.A, Francis, F, Saillour, Y, Bahi, N, Manouvrier, S, Fallet-Bianco, C, Pasquier, L, Toutain, A, Tuy, F.P.D, Bienvenu, T, Joriot, S, Odent, S, Ville, D, Desguerre, I, Goldenberg, A, Moutard, M, Fryns, J, van Esch, H, Harvey, R.J, Siebold, C, Flint, J, Beldjord, C Chelly, J (2007) Large spectrum of lissencephaly and pachygyria phenotypes resulting from de novo missense mutations in tubulin alpha 1A (TUBA1A). Hum Mutat 28:1055-1064.
- Pownall, M.E., Gustafsson, M.K Emerson, C.P.J (2002) Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. Annu Rev Cell Dev Biol 18:747-783.
- Price, M.G., Yoo, J.W, Burgess, D.L, Deng, F, Hrachovy, R.A, Frost, J.D.J Noebels, J.L (2009) A triplet repeat expansion genetic mouse model of infantile spasms syndrome, Arx(GCG)10+7, with interneuronopathy, spasms in infancy, persistent seizures, and adult cognitive and behavioral impairment. J Neurosci 29:8752-8763.
- Quillé, M., Carat, S, Quéméner-Redon, S, Hirchaud, E, Baron, D, Benech, C, Guihot, J, Placet, M, Mignen, O, Férec, C, Houlgatte, R Friocourt, G (2011) High-throughput analysis of promoter occupancy reveals new targets for arx, a gene mutated in mental retardation and interneuronopathies. PLoS One 6:e25181.
- Rakic, P. (1978) Neuronal migration and contact guidance in the primate telencephalon. Postgrad Med J 54 Suppl 1:25-40.
- Rakic, P. (2007) The radial edifice of cortical architecture: from neuronal silhouettes to genetic engineering. Brain Res Rev 55:204-219.

Rallu, M., Corbin, J.G Fishell, G (2002) Parsing the prosencephalon. Nat Rev Neurosci 3:943-951.

- Reiner, O., Carrozzo, R, Shen, Y, Wehnert, M, Faustinella, F, Dobyns, W.B, Caskey, C.T Ledbetter, D.H (1993) Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. Nature 364:717-721.
- Rio, C., Rieff, H.I, Qi, P, Khurana, T.S Corfas, G (1997) Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration. Neuron 19:39-50.

- Rodriguez-Seguel, E., Alarcon, P Gomez-Skarmeta, J.L (2009) The Xenopus Irx genes are essential for neural patterning and define the border between prethalamus and thalamus through mutual antagonism with the anterior repressors Fezf and Arx. Dev Biol 329:258-268.
- Roll, P., Rudolf, G, Pereira, S, Royer, B, Scheffer, I.E, Massacrier, A, Valenti, M, Roeckel-Trevisiol, N, Jamali, S, Beclin, C, Seegmuller, C, Metz-Lutz, M, Lemainque, A, Delepine, M, Caloustian, C, de Saint Martin, A, Bruneau, N, Depétris, D, Mattéi, M, Flori, E, Robaglia-Schlupp, A, Lévy, N, Neubauer, B.A, Ravid, R, Marescaux, C, Berkovic, S.F, Hirsch, E, Lathrop, M, Cau, P Szepetowski, P (2006) SRPX2 mutations in disorders of language cortex and cognition. Hum Mol Genet 15:1195-1207.
- Ross, A.J. Capel, B (2005) Signaling at the crossroads of gonad development. Trends Endocrinol Metab 16:19-25.
- Rudolph, J., Zimmer, G, Steinecke, A, Barchmann, S Bolz, J (2010) Ephrins guide migrating cortical interneurons in the basal telencephalon. Cell Adh Migr 4:400-408.

Sabourin, L.A. Rudnicki, M.A (2000) The molecular regulation of myogenesis. Clin Genet 57:16-25.

- Saito, T., Hanai, S, Takashima, S, Nakagawa, E, Okazaki, S, Inoue, T, Miyata, R, Hoshino, K, Akashi, T, Sasaki, M, Goto, Y, Hayashi, M Itoh, M (2011) Neocortical layer formation of human developing brains and lissencephalies: consideration of layer-specific marker expression. Cereb Cortex 21:588-596.
- Scheffer, I.E., Wallace, R.H, Phillips, F.L, Hewson, P, Reardon, K, Parasivam, G, Stromme, P, Berkovic, S.F, Gecz, J Mulley, J.C (2002) X-linked myoclonic epilepsy with spasticity and intellectual disability: mutation in the homeobox gene ARX. Neurology 59:348-356.
- Schneitz, K., Spielmann, P Noll, M (1993) Molecular genetics of Aristaless, a prd-type homeo box gene involved in the morphogenesis of proximal and distal pattern elements in a subset of appendages in Drosophila. Genes Dev 7:911.
- Seufert, D.W., Prescott, N.L El-Hodiri, H.M (2005) Xenopus aristaless-related homeobox (xARX) gene product functions as both a transcriptional activator and repressor in forebrain development. Dev Dyn 232:313-324.

- Sheen, V.L., Dixon, P.H, Fox, J.W, Hong, S.E, Kinton, L, Sisodiya, S.M, Duncan, J.S, Dubeau, F, Scheffer,
 I.E, Schachter, S.C, Wilner, A, Henchy, R, Crino, P, Kamuro, K, DiMario, F, Berg, M, Kuzniecky, R,
 Cole, A.J, Bromfield, E, Biber, M, Schomer, D, Wheless, J, Silver, K, Mochida, G.H, Berkovic, S.F,
 Andermann, F, Andermann, E, Dobyns, W.B, Wood, N.W Walsh, C.A (2001) Mutations in the Xlinked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females.
 Hum Mol Genet 10:1775-1783.
- Sheen, V.L., Feng, Y, Graham, D, Takafuta, T, Shapiro, S.S Walsh, C.A (2002) Filamin A and Filamin B are co-expressed within neurons during periods of neuronal migration and can physically interact. Hum Mol Genet 11:2845-2854.
- Sheen, V.L., Ganesh, V.S, Topcu, M, Sebire, G, Bodell, A, Hill, R.S, Grant, P.E, Shugart, Y.Y, Imitola, J, Khoury, S.J, Guerrini, R Walsh, C.A (2004) Mutations in ARFGEF2 implicate vesicle trafficking in neural progenitor proliferation and migration in the human cerebral cortex. Nat Genet 36:69-76.
- Shim, S.Y., Wang, J, Asada, N, Neumayer, G, Tran, H.C, Ishiguro, K, Sanada, K, Nakatani, Y Nguyen,
 M.D (2008) Protein 600 is a microtubule/endoplasmic reticulum-associated protein in CNS neurons. J Neurosci 28:3604-3614.
- Shinozaki, Y., Osawa, M, Sakuma, H, Komaki, H, Nakagawa, E, Sugai, K, Sasaki, M Goto, Y (2009) Expansion of the first polyalanine tract of the ARX gene in a boy presenting with generalized dystonia in the absence of infantile spasms. Brain Dev 31:469-472.
- Shoubridge, C., Cloosterman, D, Parkinson-Lawerence, E, Brooks, D Gecz, J (2007) Molecular pathology of expanded polyalanine tract mutations in the Aristaless-related homeobox gene. Genomics 90:59-71.
- Shoubridge, C., Fullston, T Gecz, J (2010) ARX spectrum disorders: making inroads into the molecular pathology. Hum Mutat 31:889-900.
- Shoubridge, C., Tan, M.H, Fullston, T, Cloosterman, D, Coman, D, McGillivray, G, Mancini, G.M, Kleefstra, T Gecz, J (2010) Mutations in the nuclear localization sequence of the Aristaless related homeobox; sequestration of mutant ARX with IPO13 disrupts normal subcellular distribution of the transcription factor and retards cell division. Pathogenetics 3:1.

- Shu, T., Ayala, R, Nguyen, M, Xie, Z, Gleeson, J.G Tsai, L (2004) Ndel1 operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning. Neuron 44:263-277.
- Spalice, A., Parisi, P, Nicita, F, Pizzardi, G, Del Balzo, F Iannetti, P (2009) Neuronal migration disorders: clinical, neuroradiologic and genetics aspects. Acta Paediatr 98:421-433.
- Spinosa, M.J., Liberalesso, P.B.N, Vieira, S.C, Olmos, A.S.F Lohr, A.J (2006) Lissencephaly, abnormal genitalia and refractory epilepsy: case report of XLAG syndrome. Arq Neuropsiquiatr 64:1023-1026.
- Spreafico, R., Battaglia, G, Arcelli, P, Andermann, F, Dubeau, F, Palmini, A, Olivier, A, Villemure, J.G, Tampieri, D, Avanzini, G Avoli, M (1998) Cortical dysplasia: an immunocytochemical study of three patients. Neurology 50:27-36.
- Spreafico, R., Tassi, L, Colombo, N, Bramerio, M, Galli, C, Garbelli, R, Ferrario, A, Lo Russo, G Munari, C (2000) Inhibitory circuits in human dysplastic tissue. Epilepsia 41 Suppl 6:S168-73.
- Stallmeyer, B., Fenge, H, Nowak-Göttl, U Schulze-Bahr, E (2010) Mutational spectrum in the cardiac transcription factor gene NKX2.5 (CSX) associated with congenital heart disease. Clin Genet 78:533-540.
- Stenman, J., Toresson, H Campbell, K (2003) Identification of two distinct progenitor populations in the lateral ganglionic eminence: implications for striatal and olfactory bulb neurogenesis. J Neurosci 23:167-174.
- Stossel, T.P., Condeelis, J, Cooley, L, Hartwig, J.H, Noegel, A, Schleicher, M Shapiro, S.S (2001) Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 2:138-145.
- Strømme, P., Sundet, K, Mørk, C, Cassiman, J.J, Fryns, J.P Claes, S (1999) X linked mental retardation and infantile spasms in a family: new clinical data and linkage to Xp11.4-Xp22.11. J Med Genet 36:374-378.
- Stromme, P., Mangelsdorf, M.E, Scheffer, I.E Gecz, J (2002) Infantile spasms, dystonia, and other Xlinked phenotypes caused by mutations in Aristaless related homeobox gene, ARX. Brain Dev 24:266-268.

- Stromme, P., Mangelsdorf, M.E, Shaw, M.A, Lower, K.M, Lewis, S.M.E, Bruyere, H, Lutcherath, V, Gedeon, A.K, Wallace, R.H, Scheffer, I.E, Turner, G, Partington, M, Frints, S.G.M, Fryns, J, Sutherland, G.R, Mulley, J.C Gecz, J (2002) Mutations in the human ortholog of Aristaless cause Xlinked mental retardation and epilepsy. Nat Genet 30:441-445.
- Stumm, R.K., Zhou, C, Ara, T, Lazarini, F, Dubois-Dalcq, M, Nagasawa, T, Höllt, V Schulz, S (2003) CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. J Neurosci 23:5123-5130.
- Tabata, H. Nakajima, K (2003) Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. J Neurosci 23:9996-10001.
- Tajbakhsh, S. Buckingham, M (2000) The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. Curr Top Dev Biol 48:225-268.
- Tanaka, T., Serneo, F.F, Higgins, C, Gambello, M.J, Wynshaw-Boris, A Gleeson, J.G (2004) Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. J Cell Biol 165:709-721.
- Tanaka, D.H., Maekawa, K, Yanagawa, Y, Obata, K Murakami, F (2006) Multidirectional and multizonal tangential migration of GABAergic interneurons in the developing cerebral cortex. Development 133:2167-2176.
- Tanaka, D.H., Yanagida, M, Zhu, Y, Mikami, S, Nagasawa, T, Miyazaki, J, Yanagawa, Y, Obata, K Murakami, F (2009) Random walk behavior of migrating cortical interneurons in the marginal zone: time-lapse analysis in flat-mount cortex. J Neurosci 29:1300-1311.
- Tassi, L., Colombo, N, Garbelli, R, Francione, S, Lo Russo, G, Mai, R, Cardinale, F, Cossu, M, Ferrario, A, Galli, C, Bramerio, M, Citterio, A Spreafico, R (2002) Focal cortical dysplasia: neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and surgical outcome. Brain 125:1719-1732.
- Tiveron, M., Rossel, M, Moepps, B, Zhang, Y.L, Seidenfaden, R, Favor, J, König, N Cremer, H (2006) Molecular interaction between projection neuron precursors and invading interneurons via stromal-derived factor 1 (CXCL12)/CXCR4 signaling in the cortical subventricular zone/intermediate zone. J Neurosci 26:13273-13278.

- Tsai, J., Chen, Y, Kriegstein, A.R Vallee, R.B (2005) LIS1 RNA interference blocks neural stem cell division, morphogenesis, and motility at multiple stages. J Cell Biol 170:935-945.
- Tucker, M., Sieber, M, Morphew, M Han, M (2005) The Caenorhabditis elegans aristaless orthologue, alr-1, is required for maintaining the functional and structural integrity of the amphid sensory organs. Mol Biol Cell 16:4695-4704.
- Uyanik, G., Aigner, L, Martin, P, Gross, C, Neumann, D, Marschner-Schafer, H, Hehr, U Winkler, J (2003) ARX mutations in X-linked lissencephaly with abnormal genitalia. Neurology 61:232-235.
- Valiente, M. Marín, O (2010) Neuronal migration mechanisms in development and disease. Curr Opin Neurobiol 20:68-78.
- Van Reeuwijk, J., Brunner, H.G van Bokhoven, H (2005) Glyc-O-genetics of Walker-Warburg syndrome. Clin Genet 67:281-289.
- Verrotti, A., Spalice, A, Ursitti, F, Papetti, L, Mariani, R, Castronovo, A, Mastrangelo, M Iannetti, P (2010) New trends in neuronal migration disorders. Eur J Paediatr Neurol 14:1-12.
- Wigle, J.T. Eisenstat, D.D (2008) Homeobox genes in vertebrate forebrain development and disease. Clin Genet 73:212-226.
- Wilson, S.W. Rubenstein, J.L (2000) Induction and dorsoventral patterning of the telencephalon. Neuron 28:641-651.
- Wolanski, M., Khosrowshahian, F, Kelly, L.E, El-Hodiri, H.M Crawford, M.J (2009) xArx2: an aristaless homolog that regulates brain regionalization during development in Xenopus laevis. Genesis 47:19-31.
- Wonders, C.P., Taylor, L, Welagen, J, Mbata, I.C, Xiang, J.Z Anderson, S.A (2008) A spatial bias for the origins of interneuron subgroups within the medial ganglionic eminence. Dev Biol 314:127-136.
- Xu, Q., Cobos, I, De La Cruz, E, Rubenstein, J.L Anderson, S.A (2004) Origins of cortical interneuron subtypes. J Neurosci 24:2612-2622.

- Ying, Z., Gonzalez-Martinez, J, Tilelli, C, Bingaman, W Najm, I (2005) Expression of neural stem cell surface marker CD133 in balloon cells of human focal cortical dysplasia. Epilepsia 46:1716-1723.
- Yokota, Y., Gashghaei, H.T, Han, C, Watson, H, Campbell, K.J Anton, E.S (2007) Radial glial dependent and independent dynamics of interneuronal migration in the developing cerebral cortex. PLoS One 2:e794.
- Yoshihara, S., Omichi, K, Yanazawa, M, Kitamura, K Yoshihara, Y (2005) Arx homeobox gene is essential for development of mouse olfactory system. Development 132:751-762.
- Yu, F.H., Mantegazza, M, Westenbroek, R.E, Robbins, C.A, Kalume, F, Burton, K.A, Spain, W.J, McKnight, G.S, Scheuer, T Catterall, W.A (2006) Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. Nat Neurosci 9:1142-1149.
- Yu, Y.E., Wen, L, Silva, J, Li, Z, Head, K, Sossey-Alaoui, K, Pao, A, Mei, L Cowell, J.K (2010) Lgi1 null mutant mice exhibit myoclonic seizures and CA1 neuronal hyperexcitability. Hum Mol Genet 19:1702-1711.
- Zoghbi, H.Y. Orr, H.T (2000) Glutamine repeats and neurodegeneration. Annu Rev Neurosci 23:217-247.

ANNEXES

I/ Revue: "Cell-autonomous and cell-to-cell signalling events in normal and altered neuronal migration".

Résumé

Le cortex cérébral est une structure complexe en six couches contenant une importante diversité de neurones possédant de nombreuses connectivités. La migration neuronale à partir des zones progénitrices vers les couches corticales de destination constitue une étape très importante, qui est précisément orchestrée par de nombreux de signaux extrinsèques et intrinsèques. Dans cette revue, nous avons détaillé ces différents facteurs pouvant moduler la migration neuronale de façon cellule autonome ou par des mécanismes de signalisation de cellule à cellule. Enfin, l'impact de certains facteurs environnementaux pouvant modifier la migration neuronale et ainsi altérer la fonction cérébrale a été également décrit.

Jean-Bernard Manent,^{1,2,3} Shirley Beguin,^{1,2,3} Thibault Ganay^{1,2,3} and Alfonso Represa^{1,2,3}

¹Inserm Unité 901, Marseille, France

²Université de la Méditerranée, UMR S901 Aix-Marseille 2, France

³INMED, Marseille 13009, France

Keywords: animal models, cortical development, developmental disorders, interneurons

Abstract

The cerebral cortex is a complex six-layered structure that contains an important diversity of neurons, and has rich local and extrinsic connectivity. Neuronal migration from neurogenic areas to destination fields constitutes a very important step, which is precisely regulated by the number of extrinsic and intrinsic cues that are required for timely formation of specific and selective neuronal circuits. In this review these factors will be described, before describing the impact of some environmental factors that alter neuronal migration and comment on their adverse impact on brain function.

Introduction

The cerebral cortex is a complex six-layered structure that contains an important diversity of neurons, and has rich local and extrinsic connectivity. This structure forms through tightly regulated processes, including proliferation of neural precursors and specification of neuronal subtypes, migration of young neurons, and establishment of synaptic contacts (Rakic, 2007; Clowry *et al.*, 2010). Because migrating neurons are long-distance travellers, precisely regulating their journey is crucial to ensure an appropriate final positioning within developing neuronal networks, and consequently prevent cortical malformations. Improper neuronal migrations are indeed important causes of malformations of cortical development that lead to mental retardation, epilepsy and other neurological syndromes (Guerrini & Parrini, 2010).

In addition to being generated in different germinal zones, distinct neuronal subtypes also use different migratory modalities to reach their final destinations. Pyramidal glutamatergic neurons originate in the pallial ventricular zone (VZ) and migrate radially to reach the cortical plate (Kriegstein & Noctor, 2004). γ -Aminobutyric acid (GABA)ergic interneurons mainly originate in the subpallium and migrate tangentially over long distances (Corbin *et al.*, 2001). It must be noted that migrating interneurons have to switch from tangential to radial migration and leave their migratory streams to reach their final destination in the cortical plate (Ang *et al.*, 2003).

If the direction of migration differs, the migratory modes used by both pyramidal cells and interneurons, however, share striking similarities: they both rely on tightly regulated movements of their guiding and trailing processes, as well as on those of their nuclei, they

E-mail: alfonso.represa@inserm.fr

require cell-to-cell contacts and have to interpret guiding cues while migrating. Early generated pyramidal neurons migrate independently of radial glial fibres by shortening their leading processes as their soma move rapidly toward the pial surface. This mode of migration is known as somal translocation (Nadarajah et al., 2001). When the distance between their birthplace and their final destination increases as corticogenesis continues, pyramidal neurons generated later migrate along radial glial fibres by using a three-step migratory mode (Kriegstein & Noctor, 2004). In this 'standard' three-step migratory mode utilized by both pyramidal cells and interneurons, neurons first extend a leading process, then translocate their nucleus into the leading process (i.e. nucleokinesis) and finally retract their trailing process, before they repeat this three-step cycle in a saltatory manner (Ayala et al., 2007). Locomotion requires attachment to radial glial fibres, and is used by pyramidal neurons after they leave the intermediate zone and change their morphology from a multipolar to a bipolar shape (Nadarajah & Parnavelas, 2002; Tabata & Nakajima, 2003). Whereas pyramidal neurons usually have a single leading process while undergoing locomotion, tangentially migrating interneurons extend leading process branches - a feature that reflects an intense exploratory behaviour (Métin et al., 2006; Valiente & Marín, 2010). Even though they do not seem to require contacts with radial glial cells, direct interactions with other cell types (including other migrating interneurons) have been proven crucial for interneuronal navigation toward their target fields, as well as external guiding cues.

Here, we will review mechanisms that enable a precise regulation of pyramidal cells and interneuronal migrations by focusing on the cellautonomous events controlling leading process dynamics and branching, nuclear movement, as well as on the cell-to-cell signalling events modulating cell adhesion and guidance (Fig. 1). Finally, among the modulatory signals involved in regulating neuronal migrations, we choose to emphasize the crucial role played by neurotransmitters and

Correspondence: Dr A. Represa, ³INMED, as above.

Received 12 June 2011, revised 2 August 2011, accepted 9 August 2011

Colour online, B&W in print



FIG. 1. Mechanisms controlling pyramidal cell and interneuron migration in the cerebral cortex. Molecular actors involved in radial migration (pyramidal neurons migrating along a radial glial cell, top panel) and tangential migration (interneurons, bottom panel) are listed in relation to their roles/functions. Blue colour refers to cell-autonomous mechanisms and green colour to cell-to-cell signalling events. Note that a large number of listed molecules are involved in both radial and tangential migration.

to illustrate the adverse effects of some environmental factors interfering with their actions.

Cell-autonomous events

Leading process dynamics and branching

Migrating neurons harbour a highly specialized process that, by its polarized location at the leading edge of the cell, is considered as a crucial sensing organ. This so-called leading process is an extremely dynamic entity utilized by migrating neurons to sense their surrounding environment and to determine the directionality of movement. Leading process morphological properties differ in migrating pyramidal neurons and interneurons. Whereas migrating pyramidal neurons display a typical bipolar morphology characterized by a single and unbranched leading process oriented forward, interneurons extend leading process branches when migrating. This difference is most likely due to the fact that pyramidal neurons undergoing locomotion are highly dependent to radial glial fibres that might impose the presence of a single guiding entity. Interneurons instead navigate in a more exploratory fashion and have to interpret guidance cues to determine what direction to follow. They thus frequently extend or retract branches, and change direction when receiving attractive or repulsive signals. Nevertheless, the leading process dynamics appears crucial for both migrating pyramidal cells and interneurons as altering this dynamics is associated with impaired migration. Although the molecules and mechanisms involved in regulation of the leading process dynamics are mostly unknown, some actors have been identified. Among them, the cyclin-dependent kinase Cdk5 was found to be crucial in modulating the leading process extension in migrating pyramidal neurons. Migrating pyramidal neurons expressing a dominant-negative form of Cdk5 (DN-CDK5) after in utero electroporation do not migrate to the cortical plate, and their leading processes morphology is found to be severely affected (Kawauchi et al., 2006).

In addition to being unable to exhibit the typical multipolar morphology in the lower intermediate zone, DN-CDK5-expressing neurons remain round-shaped and extend thinner processes compared with controls. Moreover, whereas control neurons normally transition

 from multipolar to bipolar shape in the upper IZ, DN-CDK5-expressing neurons in the upper IZ often lose their leading processes or, when present, their leading processes appear abnormal. RNAimediated knockdown of p27^{kip1} further revealed this effect to be mediated via Cdk5-dependent phosphorylation of p27^{kip1}, leading to its stabilization in migrating neurons and resulting in the maintenance of appropriate levels of F-actin in leading processes.

Another important protein is the small GTP-binding protein Rnd2, a Rho GTPase of the Rnd subfamily. Rnd2 is expressed in the cortical subventricular zone (SVZ) and intermediate zone, and is absent in the cortical plate (Nakamura et al., 2006; Heng et al., 2008). Migrating pyramidal neurons expressing after in utero electroporation a wildtype form or a constitutively active form of Rnd2, but not a mutant form, fail to reach the cortical plate and adopt an abnormal morphology (Nakamura et al., 2006). Similarly, RNAi-mediated knockdown of Rnd2 in migrating pyramidal neurons after ex vivo electroporation and slice culture reveals an altered radial migration (Heng et al., 2008). In Rnd2-RNAi transfected brains, transfected pyramidal neurons fail to reach the cortical plate and accumulate in the cortical VZ/SVZ. In addition, Rnd2 knockdown increases the amount of transfected pyramidal cells exhibiting a multipolar morphology in the IZ, as well as the number of uni/bipolar pyramidal cells displaying 2 highly atypical branched leading processes in the upper IZ and CP, a phenomenon never seen in controls.

The microtubule-associated protein p600 is another crucial regulator of the leading process dynamics in migrating pyramidal neurons. RNAi-mediated p600 knockdown in migrating pyramidal neurons results in an abnormal neuronal migration, with cells failing to reach the cortical plate and accumulating in the SVZ and IZ (Shim *et al.*, 2008). In addition, p600-deficient uni/bipolar neurons in the IZ exhibit a highly abnormal morphology compared with controls, with thinner and undulated leading processes.

The lissencephaly-associated genes Lis1 and DCX, in addition to their roles during nucleokinesis (see below), are also involved in regulating the leading process dynamics and branching in both pyramidal cells and migrating interneurons. In utero RNAi-mediated knockdown of DCX in rat embryos results in pyramidal neurons accumulated at the multipolar stage in the IZ (Bai et al., 2003). Similarly, in utero RNAi-mediated knockdown of Lis1 in rat embryos prevents migrating pyramidal neurons to transition from the multipolar to the bipolar stage and, consequently, multipolar cells with increased numbers of branches accumulate at the VZ/SVZ (Tsai et al., 2005). Migrating interneurons also require proper DCX and Lis1 functions. First, Dcx-deficient migrating interneurons in Dcx knockout mice extend leading processes that branch more frequently and remain 3 unstable compared with wild-type ones (Friocourt et al., 2006; Kappeler et al., 2006). Second, migrating interneurons in heterozygous Lis1 knockout mice, unlike controls, extend long leading processes that never branched (Nasrallah et al., 2006).

Nuclear movement

Nuclear movement, or nucleokinesis, comprises two phases that characterize the typical saltatory movement of migrating neurons: first, a cytoplasmic dilation forms in the leading process, followed by a forward movement of the centrosome (and the Golgi apparatus) into this swelling. This first step is associated with the leading process extension. Second, the nucleus moves forward, following the centrosome. This second step is usually associated with a leading process arrest or branching. A large amount of proteins are known to participate in nuclear movement, which requires coordinated pulling and pushing forces controlled by motor and cytoskeleton-related proteins, and organized around a perinuclear microtubule network. Among these, a major actor is Lis1, a protein that binds microtubules and promotes their stability. Lis1 gene is part of a highly conserved family of genes that in lower eukaryotes control nuclear distribution, a phenomenon sharing striking similarities with nucleokinesis. Lis1 interacts, among other proteins, with cytoplasmic dynein, its regulatory complex dynactin and proteins in the dynein pathway such as Nudel. Analysis of migrating cerebellar neurons expressing a RFP-tagged version of Lis1 together with a green fluorescent protein (GFP)-tagged version of the centrosome-associated protein centrin-2 reveals Lis1 is associated with the centrosome in migrating neurons (Tanaka et al., 2004a,b). In addition, nucleus-to-centrosome coupling in Lis1-deficient neurons is found to be affected in heterozygous knockout mice, and similar defects are observed in wild-type neurons when cytoplasmic dynein function is inhibited (Tanaka et al., 2004a,b). In utero RNAi-mediated knockdown of Lis1, dynein and Nudel in migrating pyramidal neurons further confirmed these observations, and reveals that these three proteins operate synergistically (Shu et al., 2004). First, in both transfected cortical neurons in culture and migrating pyramidal neurons after in utero electroporation, Lis1, dynein and Nudel1 loss-of-function results in a defective nucleus-to-centrosome coupling leading to abnormal migration. Second, rescue experiments show that improper neuronal migration in Nudel1-RNAi animals is partially rescued by concomitant Lis1 overexpression, whereas this rescue is not observed in dynein-RNAi animals. However, migration defects in Lis1-RNAi animals are not rescued by concomitant overexpression of Nudel1. These observations suggest that coordinated actions of Lis1, dynein and Nudel are essential for regulating nuclear translocation, and may explain lamination deficits in lissencephalic patients with LIS1 mutations.

Recent observations highlighted the role of SUN (Sad1p/UNC-84)–KASH (Klarsicht/ANC-1/Syne Homology) proteins during nucleokinesis and nucleus-to-centrosome coupling (Zhang *et al.*, 2009). Interestingly, the SUN–KASH proteins SUN1/2 and Syne-1/2 were proposed to transmit the forces from the microtubule motor proteins to the nucleus via molecular complexes involving SUN1/2, Syne-1/2, dynein/dynactin/Lis1 and nuclear lamins, thus clarifying how dynein-mediated pulling forces are transferred to the nucleus.

DCX and Dclk are microtubule-associated proteins with partially redundant functions that interact with microtubules and promote their polymerization and stabilization (Horesh et al., 1999; Koizumi et al., 2006). DCX mutations are responsible for X-linked lissencephaly in males, and for subcortical band heterotopia or double cortex syndrome in female patients (Gleeson et al., 1998; des Portes et al., 1998). DCX and Dclk knockout mice show no cortical lamination deficits, except minor hippocampal abnormalities (Corbo et al., 2002), whereas DCX and Dclk double knockout mice show an exacerbated phenotype confirming the redundancy of the two genes function (Deuel et al., 2006; Koizumi et al., 2006; Tanaka et al., 2006). Analysis of 5 nucleokinesis in DCX-deficient migrating interneurons reveals that these cells display enlarged centrosome-containing cytoplasmic dilations that, instead of moving gradually forward as controls, move forward and backward in the leading process (Kappeler et al., 2006). Moreover, whereas movement of the cytoplasmic dilations is tightly associated with a forward movement of the nucleus in controls, this coordinated forward movement is lost in DCX-deficient migrating interneurons. In line with this, analysis of the centrosome dynamics in GFP-expressing pyramidal neurons transfected with DCX shRNAs and expressing a RFP-tagged centrosomal protein revealed an exacerbated

but mostly random centrosomal motility (Sapir et al., 2008). Interestingly, defective nucleus to centrosome coupling in Lis1-deficient migrating neurons is rescued when DCX is concomitantly expressed (Tanaka et al., 2004a,b). Additional control of DCX function is obtained through multiple kinases and phosphatases (JNK, CDK5, PKA, MARK2/PAR-1 and PP2A) that, via phosphorylation/dephosphorylation cycles, regulate DCX affinity to microtubules (Schaar et al., 2004; Tanaka et al., 2004a,b; Sapir et al., 2008). In addition to its function for regulating DCX affinity to microtubules (Tanaka et al., 2004a,b), Cdk5 is known to phosphorylate other targets, such as the microtubule-associated protein MAP1B (Kawauchi et al., 2005), or kinases like the focal adhesion kinase (FAK; Xie et al., 2003). For the latter, migrating pyramidal neurons overexpressing a non-phoshorylatable form of FAK after in utero electroporation fail to migrate to the cortical plate and accumulate in the IZ. In addition, these cells exhibit an abnormal nuclear morphology and organization of the perinuclear microtubule network. To note, Cdk5 function depends on activation by its neuronal-specific activators p35 and p39 (Ko et al., 2001).

Another actor is the Ser/Thr kinase LKB1, an orthologue of the *C. elegans* polarity protein Par4. RNAi-mediated LKB1 knockdown in migrating pyramidal neurons after *in utero* electroporation results in impaired migration with neurons accumulated in the cortical IZ (Asada *et al.*, 2007). Analysis of centrosome-to-nucleus distance in LKB1-RNAi neurons further revealed an increased distance in migrating neurons compared with controls, associated with an increased number of differentiated neurons with an upside-down orientation.

Most of the molecular actors cited above are involved in regulating the nucleus forward movement via pulling forces organized around the perinuclear microtubule network. Pushing forces at the rear of the nucleus are also required, the major actor being myosin II. Myosin II is found accumulated at the rear of migrating interneurons, and its inhibition by blebbistatin abolishes saltatory nuclear movements (Bellion et al., 2005). In addition, inhibiting nuclear movements with blebbistatin causes perinuclear protrusions to form laterally, and nuclei could occasionally move into them. This further reveals that, in addition to its crucial role for the nucleus forward movement, myosin II is also essential for maintaining the nucleus aligned with the centrosome in the leading process. More recently, time-lapse analysis of actin dynamics in migrating interneurons expressing a GFP-fused reporter peptide interacting with F-actin provided an interesting description of actin remodelling during nuclear movement (Martini & Valdeolmillos, 2010). Whereas actin is homogeneously distributed around the nucleus when interneurons are stationary, actin was found to transiently condense at the rear of the nucleus concomitantly to the forward displacement of the nucleus. Moreover, F-actin and myosin II were observed to display a similar expression pattern at the rear pole of the nucleus and, consistently with this, blebbistatin treatment abolished both actin condensations and nuclear movement, thus confirming that actomyosin contraction controls nuclear translocation as already proposed by Bellion et al. (2005).

To note, the microtubule subunit composition is another crucial element for neuronal migration as exemplified by identified mutations in tubulin-alpha1 (Keays *et al.*, 2007) and tubulin-beta2b (Jaglin *et al.*, 2009) in human lissencephalic or polymicrogyric patients.

Cell-to-cell signalling events

Cell-to-cell interactions

Adhesion with radial glial cells/integrity of the glial scaffold

Radial glial cells have a dual role during corticogenesis in the sense they both are the progenitors of cortical pyramidal neurons and their

guide when they migrate to the cortical plate. Interactions between migrating pyramidal neurons and radial glial fibres are thus extremely crucial for neuronal locomotion and acquisition of the appropriate laminar positioning. Large amounts of proteins belonging to the class of membrane-bound cell adhesion molecules have been described, as well as proteins that control interactions between membrane-bound proteins and the cytoskeleton. Among them, Neuregulins and Astrotactins were the first molecules identified as mediating, together with their receptors, neuron-to-glia interaction in migrating cerebral and/or cerebellar neurons (Anton et al., 1997; Rio et al., 1997; Adams et al., 2002). Astrotactin (Astn1) is expressed on the surface of migrating cerebellar neurons, and treatment with antibodies against astrotactin blocks their migration in vitro (Fishell & Hatten, 1991). Time-lapse microscopy analysis of Astn1 localization in migrating cerebellar neurons expressing a Venus-tagged version of Astn1 reveals this protein constantly accumulates at the front of the soma and in the base of the leading process when neurons migrate. This protein accumulation could correspond to a new site of adhesion between the migrating neuron and its glial guide as migration proceeds (Wilson et al., 2010). Astn2, another member of the Astrotactin family, was recently identified as a potential regulator of Astn1 protein levels on the membrane of migrating neurons (Wilson et al., 2010). Neuregulins and their receptors are expressed by both migrating cortical and cerebellar neurons and radial glial cells (Anton et al., 1997; Rio et al., 1997). Incubation with exogenous neuregulins was found to promote cortical neuron migration on radial glial fibres in an in vitro assay, while incubation with blocking antibodies drastically retards migration (Anton et al., 1997). In addition, cerebellar neurons migration on glial cells expressing a dominant-negative form of the neuregulin receptor Erb4 in vitro is impaired compared with migration on wild-type glial cells (Rio et al., 1997).

Several integrin subunits expressed in the developing brain have also been found to be crucial for neuronal migration and adhesive interactions between migrating neurons and glial cells. α_3 integrin subunit is expressed by migrating neurons in the cortical VZ/IZ, decorating their leading and trailing processes, and surrounding their plasma membrane. $\alpha_{\rm V}$ integrin subunit is primarily expressed by radial glial cells (Anton et al., 1999). In an in vitro assay, incubation with anti- α_3 antibodies reduces cortical neuron migration on radial glia, without affecting their attachment. In contrast, incubation with anti- $\alpha_{\rm V}$ antibodies leads to reduced migration, retraction of both leading and trailing processes, and eventually detachment from radial glia (Anton et al., 1999). Consistent with this, α_3 mutant mice show an abnormal cortical lamination (Anton et al., 1999; Schmid et al., 2004). Timelapse microscopy analysis further reveals both radial and tangential abnormal migrations, associated with an impaired leading/trailing process dynamics due to a disrupted regulation of actin microfilaments in migrating neurons (Schmid et al., 2004).

Integrins are expressed as heterodimers composed of α - and β -subunits, and α_3 - and α_6 -subunits are known to interact with β_1 -subunits. Consistent with this, incubation with antibodies against β_1 alters migration *in vitro* (Anton *et al.*, 1999). Moreover, conditional removal of β_1 from neural precursors in transgenic mice results in major brain development defects that include a reduced size of the cerebral hemispheres and cerebellum, altered cortical lamination with marginal zone ectopias, and simplified and distorted cerebellar folia (Graus-Porta *et al.*, 2001). These defects, however, appear rather as a consequence of abnormal glial fibres endfeet at the pial surface, associated with an abnormal positioning of Cajal-Retzius cells, than a direct defect in neuron-to-glia interactions that appear mostly normal (Graus-Porta *et al.*, 2001). Interestingly, mice lacking α_6 -subunits display a mostly similar brain phenotype, with disrupted cortical

lamination and appearance of leptomeningeal heterotopia secondary to a disrupted basal membrane at the pial surface (Georges-Labouesse *et al.*, 1998), a phenotype that is exacerbated in α_3 and α_6 double **6** knockouts (De Arcangelis *et al.*, 1999).

Overall, these observations illustrate that maintaining the integrity of the radial glial scaffold is crucial for neuronal migration. In line with this, disruption of the pial membrane in mice with a targeted deletion of the nidogen-binding site of laminin $\gamma 1$ results in retracted radial glia endfeet at the pial surface, mislocalized Cajal-Retzius cells, and abnormally undulated cortical layers with leptomeningeal heterotopia (Halfter et al., 2002; Haubst et al., 2006). Strikingly similar brain phenotypes are observed in several knockout mice with constitutive or conditional deletions of genes resulting in disrupted pial basal lamina integrity, such as α_3 , α_6 and β_1 integrin subunits (Georges-Labouesse et al., 1998; De Arcangelis et al., 1999; Graus-Porta et al., 2001), perlecan (Costell et al., 1999), FAK (Beggs et al., 2003), integrin-linked kinase Ilk (Niewmierzycka et al., 2005), 7 GPR56 (Li et al., 2008a,b) and POMGnT1 (Hu et al., 2007). It is worth stressing that defects in radial glial endfeet at the ventricular surface are also induced when β_1 integrin signalling is blocked at the VZ on cultivated neocortical explants (Loulier et al., 2009). This last observation suggests that maintaining the integrity of pial and ventricular radial glial endfeet, as well as basal lamina at the pial and ventricular border, are crucial for neuronal migration. In line with this, the actin cross-linking protein FilaminA, in addition to its role for 8 promoting neuronal migration (reviewed in Sarkisian *et al.*, 2008), has been suggested to play a role in maintaining the VZ surface integrity. FilaminA mutations are responsible for periventricular nodular heterotopias, where neurons that failed to migrate accumulate on nodules lining the ventricular surface. Two genes involved in FilaminA regulation, FILIP (Nagano et al., 2002) and MEKK4 9 (Sarkisian et al., 2006), have been found to induce in rodents, when respectively overexpressed or knocked-down, an accumulation of cortical pyramidal cell neuroblasts in the VZ, reminiscent of the

nodules observed in human patients. Preliminary data from our laboratory obtained after *in utero* knockdown of FilaminA expression strongly support the notion that periventricular nodules could involve a disruption of the germinative field including radial glial cells, so that FilaminA would impact neuronal migration rather indirectly (Caraba-III) lona *et al.*, unpublished data).

Finally, more recently identified actors are the gap junction subunits connexin26 and 43. Both are expressed during corticogenesis (Nadarajah *et al.*, 1997; Cina *et al.*, 2007), and are found enriched at the contact points between migrating neurons and radial glial cells (Elias *et al.*, 2007). RNAi-mediated knockdown of connexin26 or 43 in migrating pyramidal neurons after *in utero* electroporation causes improper neuronal migration, and rescue experiments further revealed that the migration phenotype is prevented when connexin mutants that make connexions, but not channels, are coexpressed (Elias *et al.*, 2007). These results suggest that adhesion between migrating cortical neurons and radial glia via gap junction hemichannels, but not the presence of a pore channel, is necessary for migration. Similar observations were made in constitutive (Fushiki *et al.*, 2003) and conditional (Cina *et al.*, 2009) connexin43 knockout mice.

Adhesion with substrate

If migrating pyramidal neurons are extremely dependent on interactions with radial glial fibres along their way toward their fated layer, they have to detach from their migratory guide when the final destination is reached. Dulabon *et al.* (2000) proposed that this gliophilic to neurophilic adhesion switch involves the extracellular matrix protein Reelin (see below) through a direct interaction with $\alpha_3\beta_1$ integrins leading to their internalization. Consistent with this view, radial migration of wild-type cortical neurons in an *in vitro* assay is inhibited when exposed to Reelin, whereas migration of $\alpha_3\beta_1$ -deficient neurons is unaffected (Dulabon *et al.*, 2000). Interestingly, Dab1, an essential intracellular component of the Reelin signalling pathway, was also found to interact with β_1 integrin in a Reelin-dependent manner (Schmid *et al.*, 2005).

Tangentially migrating interneurons have to navigate onto various substrates and interact with other cell types before they reach their final destination. Along their migratory routes, some migrating interneurons appear to be associated with corticofugal axons (Métin *et al.*, 2000; Denaxa *et al.*, 2001), which suggests these fibres may serve as a migratory substrate. TAG-1, a neural adhesion molecule of the Ig superfamily, is expressed by corticofugal axons, and blocking TAG-1 with antibodies in cultivated brain slices impairs interneuronal migration (Denaxa *et al.*, 2001). However, interneuronal migration and interneurons final distribution were both found unaffected in *TAG-1*-deficient mice (Denaxa *et al.*, 2005), which suggests that adhesion **12** through TAG-1 is dispensable for migrating interneurons.

Several groups have suggested that radial glia is important for migrating interneurons (Polleux *et al.*, 2002; Poluch & Juliano, 2007; Yokota *et al.*, 2007), by observing the behaviour of migrating interneurons in contact to radial glia or after radial glia ablation. Elias *et al.* (2010) recently reported the presence of gap junctions between radial glial cells and migrating interneurons, and observed that RNAi-mediated connexin43 knockdown in migrating interneurons electroporated on cultivated slices does not inhibit their tangential migration, but strongly affects their tangential to radial orientation switch. This suggests that interactions between interneurons and radial glia via gap junctions are crucial and may contribute to the proper distribution of interneurons within cortical layers.

Lastly, a recent study from Stanco *et al.* (2009) revealed that interactions between netrin-1 and $\alpha_3\beta_1$ integrin control interneuronal navigation throughout the developing cortex, and are required for the interneurons appropriate positioning in the cerebral cortex.

Modulatory signals: guidance cues, go and stop/detachment signals

Go signals and motogenic factors

The initiation of cortical neuron migration is modulated mainly by trophic factors [brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin (NT)4, epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor (TGF) α] and neurotransmitters (GABA and glutamate), which acting as chemoatractants will stimulate the neuronal motility.

BDNF and NT4, acting on TrkB receptors, were the first factors shown to be important in stimulating migration, thanks to a simplified experiment using dissociated cortical pyramidal neuroblasts in multiwell microchemotaxis assay (Behar *et al.*, 1997). Years later Polleux *et al.* (2002) demonstrated that migrating interneurons on organotypic explants were also stimulated to migrate by these neurotrophins, and that the effects were linked to the activation of TrkB receptors, as the stimulation of migration was attenuated by the Trk-family inhibitor K252a and the number of tangentially migrating calbindin-positive neurons was significantly decreased in the cortex of TrkB-null mice.

The role of EGF and/or TGF α , well known mitogenic factors for neural precursors, on cortical neuronal migration was first suggested by Threadgill *et al.* (1995). Their phenotype analysis of animals defective for EGF receptors depicted a clear impact on cell survival and cortical anomalies, suggestive that cellular migration may have been slowed or blocked (Threadgill *et al.*, 1995). Caric *et al.* (2001) demonstrated then that migrating neuroblasts in the rostral migratory stream (RMS), the lateral cortical stream and the radial pathway might express high levels of EGF receptors while the targets of these pathways express the ligands HB-EGF and/or TGF α . These authors challenged the notion that EGF receptors (EGFRs) mediate chemotactic migration by increasing the size of the population of cells expressing threshold levels of EGFRs *in vivo* by viral transduction. Their results suggest that EGFRs triggered the migration of neurons in any investigated field, with the exception of the RMS.

The effects described here showing that molecules with complex pleiotrophic activities regulate neuronal migration increase the possibility that many other similar factors would also contribute to promote neuronal migration, thus opening the way for investigations of new candidates as, for example, hepatocyte growth factor/scatter factor, which has been found to be motogenic for GABA interneurons in cortical explants (Powell *et al.*, 2001).

Neurotransmitters GABA and glutamate are important chemoattractants for migrating neuroblasts, as explored by Behar *et al.* (1998, 2001). These authors evaluated in dissociated cells and cortical explants the impact of these transmitters by testing the impact of receptor antagonists, and thus illustrated that radial migration was triggered by *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) and GABA_B receptors. The role of these transmitters is described in more detail below.

Guidance cues and stop/detachment signals

Large amounts of proteins have been identified as regulators of both radial and tangential migrations. Among them, secreted molecules from Slits, Netrins and Semaphorins families are known to modulate both cell types migration; however, their roles are more clearly defined for migrating interneurons (see below). One extremely well characterized actor involved in the modulation of radial migration is the extracellular matrix protein Reelin, a large glycoprotein mainly secreted by Cajal-Retzius cells located in the cortical marginal zone. Reelin binds to two lipoprotein receptors, ApoER2 and VLDLR (D'Arcangelo et al., 1999; Hiesberger et al., 1999), and this binding leads to phosphorylation of its intracellular adapter Dab1 by Srcfamily tyrosine kinases SFKs (Howell et al., 1997). Dab1 phosphorylation subsequently leads to the activation of multiple downstream targets instructing neurons to settle down into appropriate layers via mostly unknown mechanisms. Cortical lamination defects found in reeler mice lacking Reelin expression are very similar to those observed in ApoER2 and VLDLR double mutants (Trommsdorff et al., 1999), as well as those seen in scrambler and yotari mice, carrying mutations in Dab1 (Sheldon et al., 1997). Recent observations revealed that the Reelin signalling pathway ability to modulate radial migration appears to rely on the actin cytoskeleton stabilization after Reelin-induced n-cofilin phosphorylation mediated by Dab1, SFK and PI3K (Chai et al., 2009). Accordingly, phosphorylated cofilin was found expressed on the leading processes of migrating neurons reaching the marginal zone (Chai et al., 2009). However, how Reelin provides positional information to migrating pyramidal neurons is still mostly unclear. Many other mechanisms that involve interactions with adhesion molecules such as integrins (Dulabon et al., 2000; see above), ephrins (Sentürk et al., 2011), among others, may also be important. Interestingly, the laminar distribution of interneurons and their morphology was found affected in the *reeler* forebrain (Yabut et al., 2007), suggesting the Reeling signalling pathway to be important for interneurons as well.

Many guidance cues controlling interneuronal migration have been identified, mediating either attractive or repulsive signals. Among

those, Neuregulin1 (Nrg1) and its receptor ErB4, in addition to their roles during radial migration (as described above), are also involved in interneuronal migration. Complementary expression of the two Nrg1 isoforms Nrg1-CRD and Nrg1-Ig, as well as their receptor ErB4, is observed in the developing telencephalon during the interneuronal migration period (Flames *et al.*, 2004). Nrg1 is a chemoattractant for migrating interneuronal migration toward the source of Nrg1 (Flames *et al.*, 2004; Martini *et al.*, 2009). Moreover, loss-of-function experiments with a dominant-negative form of Nrg1 (Flames *et al.*, 2004), combined with the analysis of *Nrg1* (Flames *et al.*, 2004) and *ErB4* (Neddens & Buonanno, 2010) mutant mice revealed impaired interneuronal migration and altered interneuron distribution.

Repellent actions mediated by class 3 Semaphorins and their receptors were also found to be crucial for interneuronal migration. Complementary expression of Sema3A and 3F, as well as their receptors Neuropilin1 and 2, is observed in the developing telencephalon during the interneuronal migration period (Marın *et al.*, 2001). Grafting experiments and slice cultures revealed that migrating interneurons avoid entrance into the developing striatum expressing Sema3A and 3F, and ectopic expression of these molecules blocks interneuronal migration on cultivated explants (Marın *et al.*, 2001). Recently, members of the Eph/ephrin system were identified as additional repulsive signals preventing migrating interneurons to enter in the developing striatum (Rudolph *et al.*, 2010). Similarly, Robo1 receptor via Neuropilin1 was recently found to be involved in preventing interneurons to enter the striatum (Hernández-Miranda *et al.*, 2010).

Lastly, another important class of molecules involved in regulating interneuronal migration is the chemokines. The CXC chemokine receptor 4 (CXCR4), a receptor for stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12), was found to be expressed by migrating interneurons (Stumm et al., 2003). Analysis of late-generated interneurons distribution in CXCR4 and SDF-1-deficient mice revealed alterations suggesting a regulatory role for SDF-1/CXCR4 on interneuronal migration (Stumm et al., 2003). SDF-1 expression was initially described as restricted to meningeal cells in the MZ (Stumm et al., 14 2003), but a more careful analysis revealed that SDF-1 is also expressed by upper-layer fated migrating pyramidal neurons in SVZ/IZ (Tissir et al., 2004; Tiveron et al., 2006). Analysis of interneurons migratory routes in CXCR4-deficient mice revealed a reduced preference for the major routes in the SVZ/IZ and MZ described in wild-type animals and, importantly, revealed a premature invasion of the cortical plate by migrating interneurons (Tiveron et al., 2006; Li et al., 2008a,b; Lopez-Bendito et al., 2008).

Neurotransmitters

As mentioned before, neuronal migration develops under intrinsic and cell population-dependent constraints. Among the later, neurotransmitters have been largely investigated and documented. It was thus proposed that transmitters, by impacting neuronal proliferation and migration control final positioning, timing and numbers of neurons reaching the appropriate target fields (Manent & Represa, 2007). In this section we will review these data and provide new evidence for α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors modulation of GABAergic neurons migration.

GABA and glutamate acting mainly on GABA_A and NMDA receptors have been shown to modulate the migration of different neuronal subtypes, including, among others, cerebellar granule cells (Komuro & Rakic, 1993, 1998), olfactory bulb neurons migrating in

13

the RMS (reviewed in Platel *et al.*, 2010), cortical and hippocampal pyramidal cell neuroblasts and interneurons (reviewed in Manent & Represa, 2007). Interestingly, the regulation of migration by neurotransmitters and receptors depends on the type of migration (radial, tangential or chain migration), the type of cells (principal glutamatergic neurons, cortical GABAergic interneurons, olfactory granule cells) and the brain area (neocortex, cerebellum, RMS). For example, pyramidal neurons migration is modulated by GABA and glutamate acting on NMDA receptors but not AMPA (Manent *et al.*, 2005), while the migration of interneurons appears to be mediated by AMPA but not NMDA receptors (Manent *et al.*, 2006).

The case of cortical/hippocampal interneurons

Different data support the notion that AMPA receptors modulate interneuronal migration. Thus, AMPA receptor activation affects the length of their processes (Poluch *et al.*, 2001; Fig. 2) as well as their GABA content (Poluch & König, 2002). Using cortico-hippocampal explants from GAD67–EGFP knock-in embryos, we previously reported that AMPA receptor blockade prevents the migration of GAD67–EGFP interneurons, which fail to populate the hippocampal primordium (Manent *et al.*, 2006). Time-lapse experiments confirmed this observation. In these experiments acute slices (400 μ m thick) were analysed using a Zeiss LSM 510 laser-scanning microscope. Slices were perfused with an artificial cerebrospinal fluid solution as described before (Manent *et al.*, 2006). Under application of AMPA the number of GAD67-EGFP cell bodies moving during the 30-min recording period was observed; this was associated with a clear reduction on the mean distance travelled by the cells still motile. A careful analysis of the body of affected neurons indicates that opposite to cells in the control condition, the cells exposed to this AMPA receptor antagonist failed to accomplish the nuclear translocation and displayed only a movement of soma balance and deformation (Fig. 2A). Treatment with this receptor antagonist did not affect in contrast the motility of the leading process, as the number or distance travelled remained similar to that recorded before treatment (Fig. 2C and D). These effects were also reproduced by the application of the calcium-permeable AMPA receptor antagonist IEM1460 (50 µM; kindly provided by Magazanik et al., 1997), chosen because receptors expressed by migrating GABA neurons are lacking GluR2 subunit and are therefore permeable to calcium (Métin et al., 2000). In conclusion, it can be proposed that glutamate acting through AMPA receptors modulates nuclear translocation without affecting the motility of the leading process. The actions of glutamate on migrating interneurons are apparently independent of NMDA receptors, as these neurons do not express functional NMDA receptors (Métin et al., 2000) and the treatment of GAD67-EGFP cortical sections with NMDA receptor antagonists failed to modify motility and migration of interneurons.

It has been well illustrated that migrating cortical interneurons express functional GABA_A (Métin *et al.*, 2000; Soria & Valdeolmillos, 2002) and GABA_B (Lopez-Bendito *et al.*, 2003) receptors. A blockade of GABA_B receptors results in an accumulation of tangentially migrating interneurons in the VZ/SVZ of cortical explants, but



FIG. 2. AMPA receptors modulate interneuron's motility. (A and B) Effect of NBQX (10 μ M) on interneuron's cell body motility. (A) Time-lapse imaging on brain 28 sections from knock-in embryos GAD67-EGFP (E15–E17) with a biphoton microscope (Zeiss LSM). For analysis, investigations were performed in 400- μ m-thick coronal sections of parietal cortex, along the deep migratory stream. Recordings of the speed of interneuron's cell body (white arrow) in both control and NBQX conditions over 1250 s (T). (B) Decreased number of both cell body moving and distance travelled by them in the focal field in the presence of AMPA receptor antagonists (10 μ M NBQX or 50 μ M IEM1460). Experiments were repeated five–seven times, and a total of 14 slices were analysed. (C and D) Effects of 50 μ M IEM1460 on interneuron leading processes motility. (C) Experimental conditions similar to that shown in (A); white arrows point motile leading process under both control and drug conditions over 1250 s. (D) The number of motile leading processes, as well as the mean distance travelled (not shown), in the presence of AMPA receptor antagonists was not modified compared with control (n = 14 slices). (E and F) Effects of NBQX on the length of leading processes. (E) Migrating cortical interneurons were measured in fixed sections with IMAGEJ software under control or drug conditions. For quantitative analysis we only considered cells displaying unbranched leading processes; in this figure only a few representative cells were shown for comparison. (F) Histograms illustrating the impact of AMPA receptor antagonists on the mean length of leading process of migrating interneurons in the presence of NBQX (10 μ M) or CNQX and compared with control conditions. For comparisons, SIGMA STAT software was used; after evaluation of the 'normal' distribution of data, Wilcoxon-test was used (***P* < 0.001).

© 2011 The Authors. European Journal of Neuroscience © 2011 Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd European Journal of Neuroscience, 1–14 the mechanisms of this action are presently not known (Lopez-Bendito et al., 2003). In our experimental paradigm the blockade of GABAA receptors did not produce any significant effect on interneuronal migration. However, it was recently reported that GABA will induce interneuron migration arrest when migrating neurons increase their expression of the potassium/chloride co-transporter KCC2 (Bortone & Polleux, 2009). It is well established that KCC2 lowers the intracellular chloride and thereby renders GABAergic transmission hyperpolarizing. It was thus proposed that a shift in the type of actions of GABA from depolarizing to hyperpolarizing would explain these results. Interestingly, a recent report by Miyoshi & Fishell (2011) indicates that interneurons generated in the medial and caudal ganglionic eminences by E12.2 initiate the radial sorting from their tangential pathway at the time when KCC2 is upregulated. These data together indicate that GABA/KCC2 modulates later migration steps of interneurons, when they settled into the appropriate cortical layer.

KCC2 has also been shown to impact neuronal maturation independently of its role as a co-transporter, likely through a cytoskeleton interaction (Li *et al.*, 2007; Horn *et al.*, 2010). It was thus shown a reduced migration of a neural cell line over-expressing after transfection of either transport-active or transport-inactive KCC2, indicating an ion transport-independent effect on migration (Li *et al.*, 2007). In line with these data, a premature expression of transportinactive KCC2 displayed a perturbed neural crest migration in transgenic embryos (Li *et al.*, 2007). Therefore, it is plausible that the effects of KCC2 on interneuron migration described by Bortone & Polleux (2009) would also be related to some extent to a cytoskeleton alteration. However, these authors demonstrated that the transport properties of KCC2 are required for its effect on inducing responsiveness to GABA as a stop signal in migrating interneurons.

Intracellular chloride homeostasis is also dependent on the action of Na-K-2Cl co-transporter NKCC1, which intrudes [Cl⁻] contributing to regulate the resting membrane potential and the depolarizing actions of GABA (Ben-Ari et al., 2007; Blaesse et al., 2009). An interesting recent report by Mejia-Gervacio et al. (2011) indicated that NKCC1 is highly expressed in migrating GABAergic neuroblasts in the RMS, but decreases at the time these neurons reach the olfactory bulb. Though NKCC1 activity was apparently necessary for maintaining normal migratory speed, the effect was independent of GABAA signalling. In fact, GABA_A receptor antagonists induced, as expected for these cell types (Platel et al., 2010), an increase of the average migration speed in control conditions, and the effect was maintained in the presence of NKCC1 blocker Bumetanide or after knockdown of the transporter after transfection with shNKCC1. These observations reinforce the notion that ion co-transporters impact neuron development though multiple functions, in this case olfactory GABA neurons through an impact on resting membrane potential (Blaesse et al., 2009). There are at present no proper investigations on the action of NKCC1 on the migration of other neuronal populations.

Finally, though most efforts were devoted to GABA and glutamate, it has also been reported that dopamine and serotonin might be modulators of interneuron migration. Thus, analysis on slice preparations of embryonic mouse forebrain (Crandall *et al.*, 2007) revealed that dopamine D1 receptor activation promotes and D2 receptor activation decreases GABA neuron migration from the medial and caudal ganglionic eminences. Analysis of mouse knockout for D1 or D2 dopamine receptors confirmed these results: D1-knockout mice displayed a decreased number of cortical GABA neurons in E15 intermediate zone, while D2-knockout mice displayed a significant increase of GABA neurons in this field (Crandall *et al.*, 2007). These effects appear to be motogenic, though an effect on migration guidance is not excluded. Similarly to the effects induced by the

activation of D1 receptors, time-lapse analysis of the migration of interneurons in embryonic mouse cortical slices revealed that the application of 5-HT decreased interneuron migration in a reversible and dose-dependent manner, and that this effect was due to the activation of 5-HT6 serotonin receptors (Riccio *et al.*, 2009).

Environmental factors

It is widely accepted that environment interacts with intrinsic genetically determined factors to modulate brain development, including neuronal migration. Gressens *et al.*, in a quite complete review published in 2001, segregated these environmental factors into several classes, including recreational drugs, maternal diseases and maternal conditions. The mechanisms of actions of these factors are not all elucidated, and unfortunately there has not been that much progress on the topic over the last decade.

We described in the previous section that neurotransmitters are main players in neuronal migration, so that an altered activity of migrating neuroblasts can modify the process and lead to migration defects. Three main pathological conditions can be included in this section: foetal alcohol syndrome (FAS); cocaine and drug abuse; and anti-epileptic drugs (AEDs), as their adverse impact on brain development are linked to their actions on receptors for neurotransmitters.

FAS

Alcohol exposure during pregnancy remains one of the leading causes of non-genetic mental retardation, and is responsible for a syndrome characterized in addition with craniofacial and cardiovascular defects (Jones & Smith, 1973). FAS represents the severe end of the FASD **16** continuum, and is typified by the presence of several neuroanatomical malformations, including microencephaly, lissencephaly, heterotopias and loss of inter-hemispheric fibre tracks. Children with FAS experience ataxia, deficits in intellectual functioning, learning and memory deficits, and problem solving and attention impairments.

Experimental analysis in laboratory animals demonstrated that the more characteristic brain alterations were the defects in organization of the cortical layers, the presence of ectopic neurons and reduction of the thickness of the cortical wall. Ethanol consumption by pregnant rats causes many types of cortical malformations in embryos exposed, including leptomeningeal and periventricular heterotopia, indicating that ethanol alters neuronal migration (Komatsu *et al.*, 2001; Sakata-Haga *et al.*, 2002). Ethanol also disrupts cortical neurogenesis and gliogenesis in embryos exposed (Miller, 1986; Gressens *et al.*, 1992a,b; Miller & Robertson, 1993). Finally, administration of **17** ethanol in the rodent newborn, what grossly corresponds to the third trimester of human gestation, causes significant neuronal death in the neocortex (Ikonomidou *et al.*, 2000; Olney *et al.*, 2002).

As described in many reports, both the severity and types of anatomical defects depend on the timing of ethanol exposure (Livy *et al.*, 2003). It was thus described that a particularly susceptible period for ethanol exposure is the third trimester (West *et al.*, 1986; Hamre & West, 1993), the period during which ethanol causes cell death (Cheema *et al.*, 2000; Mooney & Miller, 2003). *In vitro* analyses have shown that ethanol exposure during neurogenesis, grossly corresponding to the second trimester of gestational life, increases subsequent neuronal migration and neurite extension (Camarillo & Miranda, 2008). *In vivo* analysis confirmed that the **IS** disposition of tangentially migrating GABAergic neurons in the cortex was altered in mice embryos exposed to ethanol; ethanol apparently induces a premature tangential migration of interneurons into the

cortical anlage. Interestingly this effect was associated with increased ambient levels of GABA and increased sensitivity to GABA of cells derived from the medial ganglionic eminences (Cuzon *et al.*, 2008), suggesting that migration perturbations were resulting from both cell intrinsic and cell population effects.

The presence of abnormal foetal brain was also dependent on the alcohol dosage: it was observed in 100% of mothers who had high consumption of ethanol during pregnancy (100–500 mL per day, four–seven times per week), in 80–90% of mothers who had moderate consumption (100–200 mL per day, one–four times per week), and in 30% of mothers who had occasional consumption of ethanol (35–100 mL, three times during pregnancy; Konavalov *et al.*, 1997).

The deleterious effects of ethanol are related to its action on NMDA and GABA receptors. Indeed, ethanol plays a role of GABAA receptor agonist (Wafford et al., 1991; Harris et al., 1995) and NMDA receptor antagonist (Hoffman et al., 1989). The administration of ethanol in 7-day-old rat pups days leads to significant neuronal death in the neocortex, induced by the combination of two mechanisms: excessive activation of GABA receptors; and inhibition of NMDA receptors. Indeed, administration of phenobarbital, which potentiates GABA_A receptor activation, or the administration of MK801, a NMDA receptor antagonist, in rat pups cause a similar neuronal death, though of a lesser extent; the combination of the two drugs causes damage similar to that caused by ethanol alone (Ikonomidou et al., 2000). Similar results were obtained in mice (Olney et al., 2002). Ethanol consumption by pregnant rats causes many types of cortical malformations in embryos, suggesting migration defects (Komatsu et al., 2001; Sakata-Haga et al., 2002). Migratory defects associated with the administration of ethanol have also been reported by Miller (1986) and Miller & Robertson (1993). Altered migration of cerebellar granule cells was also induced by intraperitoneal administration of ethanol in raccoon (Kumada et al., 2006). Finally, ethanol disrupts cortical neurogenesis and gliogenesis (Miller, 1986; Gressens et al., 1992a,b; Miller & Robertson, 1993).

Cocaine

The question of the potential teratogenicity of cocaine has been raised after the increasing frequency of its abuse in the USA, where the National Institute of Drug Abuse (NIDA) estimates that 1.1% of pregnant women consume cocaine. Different reports concluded that exposure to cocaine during pregnancy results in increased spontaneous abortion, placental abruption, prematurity, intrauterine growth retardation and neurological deficits. Consequently, research has been investigating cocaine impact on foetal development in laboratory animals, while longitudinal studies of cocaine-exposed babies have been developed in order to determine how prenatal exposure would influence their development from birth through adolescence.

Exposure of the foetal brain to cocaine disrupted the cytoarchitecture of the cerebral cortex in primates, rodents and lagomorphs
(Gressens et al., 1992a,b; Jones et al., 2000; Lidow & Song, 2001a,b). Cocaine decreases neurogenesis (Lidow & Song, 2001a) associated with a reduction in the cortical neuronal density and cortical volume (Lidow & Song, 2001b) and altered layering (Lidow et al., 2001). Furthermore, Crandall et al. (2004) have reported that recurrent, transplacental exposure of mouse embryos to cocaine from embryonic day 8–15 (the treatment was thus covering the period of genesis of most GABAergic neurons) alters tangential neuronal migration resulting in deficits in GABAergic neuronal populations in the embryonic cerebral wall. Interestingly, this treatment seems to be specific for neocortical neurons, as olfactory GABA cells were not affected. In contradiction with these data, Wang et al. (1995)

previously reported that cocaine exposure resulted in an increased number of GABAergic neurons in the anterior cingulate cortex of rabbits exposed *in utero* to cocaine. However, the distribution of parvalbumin-immunoreactive cells has been demonstrated to be altered (Wang *et al.*, 1996), which is still compatible with an altered terminal migration of these cells.

The mechanisms of cocaine action are likely to be related to an impact on monoamine extracellular levels in the foetus (Akbari *et al.*, 1992; Clarke *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 2000). Thus, it has been suggested that monoamines can influence neurogenesis and neuronal and glial cell differentiation (Reinoso *et al.*, 1996; Vitalis *et al.*, 1998; Ohtani *et al.*, 2003).

Brain alterations in humans are most likely due to similar perturbations of neuronal proliferation and migration, which remains to be determined. Interestingly, histological analysis of a case where cocaine abuse during pregnancy was assessed by drug analysis revealed a thin cortex containing many apoptotic cells, with altered architecture due to anomalies in vascular penetration associated with anomalies in neuronal migration, cortical histogenesis and cerebral microcirculation development (Kesrouani *et al.*, 2001). Also, cell culture analysis of highly enriched human foetal brain-derived neural precursor cells indicates that cocaine treatment impacts the proliferation, migration and differentiation of these cells (Hu *et al.*, 2006).

What are the consequences if brain construction is altered upon cocaine exposure? Longitudinal studies of exposed offspring have confirmed that some children with prenatal cocaine exposure have problems with aspects of motor skills, IQ, fussiness and attention span (http://archives.drugabuse.gov/NIDA_Notes/NNVol14N3/Prenatal. html). Executive function (i.e. the ability to gather and use information **20** in pursuit of one's own aims) may also be compromised. In general, these findings are consistent with results from studies with laboratory animals. These studies, however, indicate that severe impact is restricted to some children tempering the initial concerns but still demonstrating the need for prevention campaigns. NIDA also stresses that relatively slight even undetected alterations can have potential negative consequences that are important over the long term, interfering with integration and success at the school of affected offspring or yielding societal concerns.

AEDs

AEDs belong to a large class of chemical compounds (Perucca, 2005) that: (i) facilitate the action of the inhibitory transmitter GABA by blocking degradation systems (vigabatrin) or capture (tiagabine) GABA, or potentiating the action of GABA on the GABA_A receptor subtype (benzodiazepines, phenobarbital, topiramate); (ii) decrease the action of the neurotransmitter glutamate, in particular by inhibiting its release and its interaction with glutamate receptors (carbamazepine, felbamate, topiramate, valproate); and (iii) modulate neuronal activity by blocking sodium channels and voltage-gated calcium (carbamazepine, oxcarbazepine, ethosuximide, felbamate, lamotrigine, phenytoin, topiramate, valproate, zonisamide). Some compounds also have broader targets, modulating for example enzyme systems, hormones and trophic factors. For some AEDs, the mode of action is still incompletely understood (levetiracetam, gabapentin, valproate, zonisamide).

AEDs through their modes of action are likely to affect the construction of the foetal brain. Thus, the administration of AEDs in the newborn rat pup (covering a period equivalent in humans to the third gestational trimester) causes neuronal death by apoptosis, particularly after treatment with phenytoin, phenobarbital, diazepam, clonazepam, vigabatrin and valproate (Bittigau *et al.*, 2002). Admin-

istration of high doses of valproate at the end of the first week of gestation in mice causes defects in neural tube closure in the embryo 21 (Ehlers et al., 1992), recalling the case of spina bifida encountered in humans (Bjerkedal et al., 1982; Robert & Guibaud, 1982; Lindhout & Schmidt, 1986). Our team (Manent et al., 2007, 2008) studied the effects of several AEDs (carbamazepine, diazepam, lamotrigine, levetiracetam, phenobarbital, topiramate, valproate, vigabatrin) administered intraperitoneally in the last week of gestation in the rat, thus covering the period of genesis/migration of cortical and hippocampal neurons. By administering AEDs at doses comparable to those used clinically, we observed an increased incidence of cortical and hippocampal dysplasia, suggesting defects in neuronal migration in pups born to treated females. These developmental anomalies (Fig. 3) were observed after treatment with valproate (100 mg/kg/day), vigabatrin (200 mg/kg/day) and lamotrigine (5-20 mg/kg/day). They include: (i) the presence of areas of neuronal depletion, causing disruptions of hippocampal or cortical lamination; and (ii) changes in compaction of cortical layers (neuronal dispersion areas, associated with the presence of ectopic neurons). In the hippocampus, the dispersion may lead to the presence of a supernumerary pyramidal layer (Fig. 3). Neuronal death by apoptosis, albeit limited, was also observed, but neuronal proliferation was not affected by AEDs treatments.

It is interesting to note that the effects of lamotrigine are dependent on the dose administered and are also associated with maternal–foetal toxicity, shown by a weight loss in females during treatment and a reduction in the number of newborn rats. Maternal–foetal toxicity was also observed after treatment with vigabatrin and carbamazepine. The observation of the adverse impact of vigabatrin and valproate to induce cortico-hippocampal dysplasia in animals exposed *in utero*, in contrast to carbamazepine, at least at the doses studied, supports the notion that disruption of GABA levels is more deleterious than blocking voltage-dependent sodium channels. Molecules that target these channels would therefore be more suitable in the treatment of epilepsy during pregnancy. These results are consistent with the role played by GABA during the early stages of development, as well as the immature sodium channels in migrating neurons (Manent *et al.*, 2005).

Taken together the findings summarized here clearly reveal the need for in-depth studies evaluating the impact of AEDs, and eventually other related drugs, on brain maturation. Experimental approaches in laboratory animals are in that sense a powerful tool for identifying these risks.

Launched in Europe in 1999 by a consortium of independent research groups and later extended to several other nations worldwide, EURAP consortium (http://www.eurapinternational.org/) has been created to collect data on the risk of AEDs during pregnancy and share it in an international registry. EURAP is involving physicians from 40 countries in Europe, Australia, Asia and South America, and have recorded more than 16 100 pregnancies. The differences in use of individual AEDs across countries probably reflect, among other factors, the lack of evidence concerning the optimal treatment of epilepsy in women of childbearing age. This register has not yet reached clear conclusions, but their 2006 report indicates that among the pregnancies followed, 6% of them had major congenital malformations, including 22 cases of defects in neural tube closure and seven



FIG. 3. AEDs generate hippocampal and cortical dysplasias. Hippocampal (C–F) and cortical (H–J) malformations induced by foetal exposure to vigabatrin (VGB), valproate (VPA) and lamotrigine (LTG) compared with controls (A, B and G). Coronal brain sections were stained with the neuronal marker NeuN for evaluating cortical and hippocampal cytoarchitectonic alterations. Examples of interruptions of lamination (blue arrows) in the hippocampus (C and D) or cortex (I and J, and asterisk in H). Examples of dispersions (green arrows) of neuronal layers resulting in the formation of a supernumerary pyramidal layer in the hippocampus (E and F) and variations in thickness of cortical layers (H). Scale bar: 200 μ m.

cases of abnormal CNS. Note that subtle alterations are likely to be under evaluated, and cognitive outcomes of offspring are not necessarily investigated.

Acknowledgements

Research in our laboratory is supported by INSERM, CNRS, Agence Nationale de la Recherche (RPV06055ASA to A.R. and RPV09010AAA to J.-B.M.), European Community [LSH-CT-2006-037315 (EPICURE) FP6-Thematic priority LIFESCIHEALTH to A.R.], Fondation Jérôme Lejeune (to J.-B.M.) and Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche (to S.B.).

Abbreviations

AED, anti-epileptic drugs; AMPA, α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; FAK, focal adhesion kinase; FAS, foetal alcohol syndrome; GABA, γ-aminobutyric acid; GFP,
green fluorescent protein; IZ, ???; MZ, ???; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; NT4, neurotrophin 4; RMS, rostral migratory stream; SDF-1, stromal cell-derived factor-1; SVZ, subventricular zone; TGF, transforming growth factor; VZ, ventricular zone.

References

- Adams, N.C., Tomoda, T., Cooper, M., Dietz, G. & Hatten, M.E. (2002) Mice that lack astrotactin have slowed neuronal migration. *Development*, **129**, 965–972.
- Akbari, H.M., Kramer, H.K., Whitaker-Azmitia, P.M., Spear, L.P. & Azmitia, E.C. (1992) Prenatal cocaine exposure disrupts the development of the serotonergic system. *Brain Res.*, 572, 57–63.
- Ang, E.S. Jr, Haydar, T.F., Gluncic, V. & Rakic, P. (2003) Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. J. Neurosci., 23, 5805–5815.
- Anton, E.S., Marchionni, M.A., Lee, K.F. & Rakic, P. (1997) Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. *Development*, **124**, 3501–3510.
- Anton, E.S., Kreidberg, J.A. & Rakic, P. (1999) Distinct functions of alfa3 and alfa(v) integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. *Neuron*, 22, 277–289.
- Asada, N., Sanada, K. & Fukada, Y. (2007) LKB1 regulates neuronal migration and neuronal differentiation in the developing neocortex through centrosomal positioning. J. Neurosci., 27, 11769–11775.
- Ayala, R., Shu, T. & Tsai, L.H. (2007) Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell*, **128**, 29–43.
- Bai, J., Ramos, R.L., Ackman, J.B., Thomas, A.M., Lee, R.V. & LoTurco, J.J. (2003) RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat. Neurosci.*, 6, 1277–1283.
- Beggs, H.E., Schahin-Reed, D., Zang, K., Goebbels, S., Nave, K.A., Gorski, J., Jones, K.R., Sretavan, D. & Reichardt, L.F. (2003) FAK deficiency in cells contributing to the basal lamina results in cortical abnormalities resembling congenital muscular dystrophies. *Neuron*, 40, 501–514.
- Behar, T.N., Dugich-Djordjevic, M.M., Li, Y.X., Ma, W., Somogyi, R., Wen, X., Brown, E., Scott, C., McKay, R.D. & Barker, J.L. (1997) Neurotrophins stimulate chemotaxis of embryonic cortical neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 9, 2561–2570.
- Behar, T.N., Schaffner, A.E., Scott, C.A., O'Connell, C. & Barker, J.L. (1998) Differential response of cortical plate and ventricular zone cells to GABA as a migration stimulus. *J. Neurosci.*, **18**, 6378–6387.
- Behar, T.N., Scott, C.A., Greene, C.L., Wen, X., Smith, S.V., Maric, D., Liu, Q.Y., Colton, C.A. & Barker, J.L. (1999) Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration. *J. Neurosci.*, 19, 4449–4461.
 - Behar, T.N., Smith, S.V., Kennedy, R.T., McKenzie, J.M., Maric, I. & Barker, J.L. (2001) GABA(B) receptors mediate motility signals for migrating embryonic cortical cells. *Cereb. Cortex*, **11**, 744–753.
 - Bellion, A., Baudoin, J.P., Alvarez, C., Bornens, M. & Métin, C. (2005) Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. J. Neurosci., 25, 5691–5699.

- Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J.L., Tyzio, R. & Khazipov, R. (2007) GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol. Rev.*, 87, 1215–1284.
- Bittigau, P., Sifringer, M., Genz, K., Reith, E., Pospischil, D., Govindarajalu, S., Dzietko, M., Pesditschek, S., Mai, I., Dikranian, K., Olney, J.W. & Ikonomidou, C. (2002) Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 15089–15094.
- Bjerkedal, T., Czeizel, A., Goujard, J., Kallen, B., Mastroiacova, P., Nevin, N., Oakley, G. Jr & Robert, E. (1982) Valproic acid and spina bifida. *Lancet*, 2, 1096.
- Blaesse, P., Airaksinen, M.S., Rivera, C. & Kaila, K. (2009) Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron*, **61**, 820–838.
- Bortone, D. & Polleux, F. (2009) KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron*, **62**, 53–71.
- Camarillo, C. & Miranda, R.C. (2008) Ethanol exposure during neurogenesis induces persistent effects on neural maturation: evidence from an ex vivo model of fetal cerebral cortical neuroepithelial progenitor maturation. *Gene Expr.*, **14**, 159–171.
- Caric, D., Raphael, H., Viti, J., Feathers, A., Wancio, D. & Lillien, L. (2001) EGFRs mediate chemotactic migration in the developing telencephalon. *Development*, **128**, 4203–4216.
- Chai, X., Förster, E., Zhao, S., Bock, H.H. & Frotscher, M. (2009) Reelin acts as a stop signal for radially migrating neurons by inducing phosphorylation of n-cofilin at the leading edge. *Commun Integr Biol.*, 2, 375–377.
- Cheema, Z.F., West, J.R. & Miranda, R.C. (2000) Ethanol induces Fas/Apo [apoptosis]-1 mRNA and cell suicide in the developing cerebral cortex. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 24, 535–543.
- Cina, C., Maass, K., Theis, M., Willecke, K., Bechberger, J.F. & Naus, C.C. (2009) Involvement of the cytoplasmic C-terminal domain of connexin43 in neuronal migration. J. Neurosci., 29, 2009–2021.
- Clarke, C., Clarke, K., Muneyyirci, J., Azmitia, E. & Whitaker-Azmitia, P.M. (1996) Prenatal cocaine delays astroglial maturation: immunodensitometry shows increased markers of immaturity (vimentin and GAP-43) and decreased proliferation and production of the growth factor S-100. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **91**, 268–273.
- Clowry, G., Molnár, Z. & Rakic, P. (2010) Renewed focus on the developing human neocortex. J. Anat., 217, 276–288.
- Corbin, J.G., Nery, S. & Fishell, G. (2001) Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in the mammalian forebrain. *Nat. Neurosci.*, 4(Suppl), 1177–1182.
- Corbo, J.C., Deuel, T.A., Long, J.M., LaPorte, P., Tsai, E., Wynshaw-Boris, A. & Walsh, C.A. (2002) Doublecortin is required in mice for lamination of the hippocampus but not the neocortex. *J. Neurosci.*, **22**, 7548–7557.
- Costell, M., Gustafsson, E., Aszódi, A., Mörgelin, M., Bloch, W., Hunziker, E., Addicks, K., Timpl, R. & Fässler, R. (1999) Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. J. Cell Biol., 147, 1109–1122.
- Crandall, J.E., Hackett, H.E., Tobet, S.A., Kosofsky, B.E. & Bhide, P.G. (2004) Cocaine exposure decreases GABA neuron migration from the ganglionic eminence to the cerebral cortex in embryonic mice. *Cereb. Cortex*, 14, 665–675.
- Crandall, J.E., McCarthy, D.M., Araki, K.Y., Sims, J.R., Ren, J.Q. & Bhide, P.G. (2007) Dopamine receptor activation modulates GABA neuron migration from the basal forebrain to the cerebral cortex. J. Neurosci., 27, 3813–3822.
- Cuzon, V.C., Yeh, P.W., Yanagawa, Y., Obata, K. & Yeh, H.H. (2008) Ethanol consumption during early pregnancy alters the disposition of tangentially migrating GABAergic interneurons in the fetal cortex. J. Neurosci., 28, 1854–1864.
- D'Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D.S., Sheldon, M. & Curran, T. (1999) Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron*, **24**, 471–479.
- De Arcangelis, A., Mark, M., Kreidberg, J., Sorokin, L. & Georges-Labouesse, E. (1999) Synergistic activities of alpha3 and alpha6 integrins are required during apical ectodermal ridge formation and organogenesis in the mouse. *Development*, **126**, 957–968.
- Denaxa, M., Chan, C.H., Schachner, M., Parnavelas, J.G. & Karagogeos, D. (2001) The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development*, **128**, 4635–4644.
- Deuel, T.A., Liu, J.S., Corbo, J.C., Yoo, S.Y., Rorke-Adams, L.B. & Walsh, C.A. (2006) Genetic interactions between doublecortin and doublecortin-like kinase in neuronal migration and axon outgrowth. *Neuron*, 49, 41–53.
- Dulabon, L., Olson, E.C., Taglienti, M.G., Eisenhuth, S., McGrath, B., Walsh, C.A., Kreidberg, J.A. & Anton, E.S. (2000) Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron*, 27, 33–44.

© 2011 The Authors. European Journal of Neuroscience © 2011 Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd European Journal of Neuroscience, 1–14

- Elias, L.A., Wang, D.D. & Kriegstein, A.R. (2007) Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature*, 448, 901–907.
- Elias, L.A., Turmaine, M., Parnavelas, J.G. & Kriegstein, A.R. (2010) Connexin 43 mediates the tangential to radial migratory switch in ventrally derived cortical interneurons. J. Neurosci., 30, 7072–7077.
- EURAP Study Group. (2006) Seizure control and treatment in pregnancy: observations from the EURAP epilepsy pregnancy registry. *Neurology*, **66**, 354–360.
- Fishell, G. & Hatten, M.E. (1991) Astrotactin provides a receptor system for CNS neuronal migration. *Development*, **113**, 755–765.
- Flames, N., Long, J.E., Garratt, A.N., Fischer, T.M., Gassmann, M., Birchmeier, C., Lai, C., Rubenstein, J.L. & Marín, O. (2004) Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron*, 44, 251–261.
- Friocourt, G., Poirier, K., Rakić, S., Parnavelas, J.G. & Chelly, J. (2006) The role of ARX in cortical development. *Eur. J. Neurosci.*, 23, 869–876.
- Fushiki, S., Perez Velazquez, J.L., Zhang, L., Bechberger, J.F., Carlen, P.L. & Naus, C.C. (2003) Changes in neuronal migration in neocortex of connexin43 null mutant mice. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 62, 304–314.
- Georges-Labouesse, E., Mark, M., Messaddeq, N. & Gansmüller, A. (1998) Essential role of a 6 integrins in cortical and retinal lamination. *Curr. Biol.*, **8**, 983–986.
- 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. & Walsh, C.A. (1998) Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell*, **92**, 63–72.
- Graus-Porta, D., Blaess, S., Senften, M., Littlewood-Evans, A., Damsky, C., Huang, Z., Orban, P., Klein, R., Schittny, J.C. & Muller, U. (2001) b1-class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. *Neuron*, **31**, 367–379.
- Gressens, P., Kosofsky, B.E. & Evrard, P. (1992a) Cocaine-induced disturbances of corticogenesis in the developing murine brain. *Neurosci. Lett.*, 140, 113–116.
- Gressens, P., Lammens, M., Picard, J.J. & Evrard, P. (1992b) Ethanol-induced disturbances of gliogenesis and neurogenesis in the developing murine brain. An in vitro and in vivo immunohistochemical, morphological, and ultrastructural study. *Alcohol Alcohol.*, **27**, 219–226.
- Gressens, P., Mesples, B., Sahir, N., Marret, S. & Sola, A. (2001) Environmental factors and disturbances of brain development. *Semin. Neonatol.*, 6, 185–194.
- Guerrini, R. & Parrini, E. (2010) Neuronal migration disorders. *Neurobiol.* Dis., 38, 154–166.
- Halfter, W., Dong, S., Yip, Y.P., Willem, M. & Mayer, U. (2002) A critical function of the pial basement membrane in cortical histogenesis. *J. Neurosci.*, 22, 6029–6040.
- Hamre, K.M. & West, J.R. (1993) The effects of the timing of ethanol exposure during the brain growth spurt on the number of cerebellar Purkinje and granule cell nuclear profiles. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **17**, 610–622.
- Harris, B.D., Moody, E.J., Gu, Z.Q. & Skolnick, P. (1995) Contribution of "diazepam-insensitive" GABAA receptors to the alcohol antagonist properties of Ro 15-4513 and related imidazobenzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 52, 113–118.
- Haubst, N., Georges-Labouesse, E., De Arcangelis, A., Mayer, U. & Götz, M. (2006) Basement membrane attachment is dispensable for radial glial cell fate and for proliferation, but affects positioning of neuronal subtypes. *Development*, **133**, 3245–3254.
- Heng, J.I., Nguyen, L., Castro, D.S., Zimmer, C., Wildner, H., Armant, O., Skowronska-Krawczyk, D., Bedogni, F., Matter, J.M., Hevner, R. & Guillemot, F. (2008) Neurogenin 2 controls cortical neuron migration through regulation of rnd2. *Nature*, 455, 114–118.
- Hernández-Miranda, L.R., Cariboni, A., Faux, C., Ruhrberg, C., Cho, J.H., Cloutier, J.F., Eickholt, B.J., Parnavelas, J.G. & Andrews, W.D. (2010) Robol regulates semaphorin signaling to guide the migration of cortical interneurons through the ventral forebrain. J. Neurosci., 31, 6174–6187.
- Hiesberger, T., Trommsdorff, M., Howell, B.W., Goffinet, A., Mumby, M.C., Cooper, J.A. & Herz, J. (1999) Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron*, 24, 481–489.
- Hoffman, P.L., Rabe, C.S., Moses, F. & Tabakoff, B. (1989) N-methyl-Daspartate receptors and ethanol: inhibition of calcium flux and cyclic GMP production. J. Neurochem., 52, 1937–1940.
- Horesh, D., Sapir, T., Francis, F., Wolf, S.G., Caspi, M., Elbaum, M., Chelly, J. & Reiner, O. (1999) Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum. Mol. Genet.*, 8, 1599–1610.

- Horn, Z., Ringstedt, T., Blaesse, P., Kaila, K. & Herlenius, E. (2010) Premature expression of KCC2 in embryonic mice perturbs neural development by an ion transport-independent mechanism. *Eur. J. Neurosci.*, 31, 2142–2155.
- Howell, B.W., Hawkes, R., Soriano, P. & Cooper, J.A. (1997) Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature*, 389, 733–737.
- Hu, S., Cheeran, M.C., Sheng, W.S., Ni, H.T., Lokensgard, J.R. & Peterson, P.K. (2006) Cocaine alters proliferation, migration, and differentiation of human fetal brain-derived neural precursor cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **318**, 1280–1286.
- Hu, H., Yang, Y., Eade, A., Xiong, Y. & Qi, Y. (2007) Breaches of the pial basement membrane and disappearance of the glia limitans during development underlie the cortical lamination defect in the mouse model of muscleeye-brain disease. J. Comp. Neurol., 502, 168–183.
- Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Stefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K. & Olney, J.W. (2000) Ethanol induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287, 1056–1060.
- Jaglin, X.H., Poirier, K., Saillour, Y., Buhler, E., Tian, G., Bahi-Buisson, N., Fallet-Bianco, C., Phan-Dinh-Tuy, F., Kong, X.P., Bomont, P., Castelnau-Ptakhine, L., Odent, S., Loget, P., Kossorotoff, M., Snoeck, I., Plessis, G., Parent, P., Beldjord, C., Cardoso, C., Represa, A., Flint, J., Keays, D.A., Cowan, N.J. & Chelly, J. (2009) Mutations in the b-tubulin gene TUBB2B result in asymmetrical polymicrogyria. *Nat. Genet.*, **41**, 746–752.
- Jones, K.L. & Smith, D.W. (1973) Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet*, **302**, 999–1001.
- Jones, L.B., Stanwood, G.D., Reinoso, B.S., Washington, R.A., Wang, H.Y., Friedman, E. & Levitt, P. (2000) In utero cocaine-induced dysfunction of dopamine, D1 receptor signaling and abnormal differentiation of cerebral cortical neurons. J. Neurosci., 20, 4606–4614.
- Kappeler, C., Saillour, Y., Baudoin, J.P., Tuy, F.P., Alvarez, C., Houbron, C., Gaspar, P., Hamard, G., Chelly, J., Métin, C. & Francis, F. (2006) Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from doublecortin knockout mice. *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 1387–1400.
- Kawauchi, T., Chihama, K., Nishimura, Y.V., Nabeshima, Y. & Hoshino, M. (2005) MAP1B phosphorylation is differentially regulated by Cdk5/p35, Cdk5/p25, and JNK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **331**, 50–55.
- Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y. & Hoshino, M. (2006) Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27kip1 contributing to actin organization and cortical neuronal migration. *Nat. Cell Biol.*, 8, 17–26.
- Keays, D.A., Tian, G., Poirier, K., Huang, G.J., Siebold, C., Cleak, J., Oliver, P.L., Fray, M., Harvey, R.J., Molnár, Z., Piñon, M.C., Dear, N., Valdar, W., Brown, S.D., Davies, K.E., Rawlins, J.N., Cowan, N.J., Nolan, P., Chelly, J. & Flint, J. (2007) Mutations in a-tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans. *Cell*, **128**, 45–57.
- Kesrouani, A., Fallet, C., Vuillard, E., Jacqz-Aigrain, E., Sibony, O., Oury, J.F., Blot, P. & Luton, D. (2001) Pathologic and laboratory correlation in microcephaly associated with prenatal cocaine exposure. *Early Hum. Dev.*, 63, 79–81.
- Ko, J., Humbert, S., Bronson, R.T., Takahashi, S., Kulkarni, A.B., Li, E. & Tsai, L.H. (2001) p35 and p39 are essential for cyclindependent kinase 5 function during neurodevelopment. *J. Neurosci.*, **21**, 6758–6771.
- Koizumi, H., Higginbotham, H., Poon, T., Tanaka, T., Brinkman, B.C. & Gleeson, J.G. (2006) Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain. *Nat. Neurosci.*, 9, 779– 786.
- Komatsu, S., Sakata-Haga, H., Sawada, K., Hisano, S. & Fukui, Y. (2001) Prenatal exposure to ethanol induces leptomeningeal heterotopia in the cerebral cortex of the rat fetus. *Acta Neuropathol.*, **101**, 22–26.
- Komuro, H. & Rakic, P. (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*, 260, 95–97.
- Komuro, H. & Rakic, P. (1998) Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. J. Neurosci., 18, 1478– 1490.
- Konavalov, H.V., Kovetsky, N.S., Bobryshev, Y.V. *et al.* (1997) Disorders of brain development in the progeny of mothers who used alcohol during pregnancy. *Early Hum. Dev.*, 48, 153–166.
- Kriegstein, A.R. & Noctor, S.C. (2004) Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.*, 27, 392–399.
- Kumada, T., Lakshmana, M.K. & Komuro, H. (2006) Reversal of neuronal migration in a mouse model of fetal alcohol syndrome by controlling secondmessenger signalings. J. Neurosci., 26, 742–756.
- Li, H., Khirug, S., Cai, C., Ludwig, A., Blaesse, P., Kolikova, J., Afzalov, R., Coleman, S.K., Lauri, S., Airaksinen, M.S., Keinänen, K., Khiroug, L.,

Factors controlling neuronal migration 13

Saarma, M., Kaila, K. & Rivera, C. (2007) KCC2 interacts with the dendritic cytoskeleton to promote spine development. *Neuron*, **56**, 1019–1033.

- Li, S., Jin, Z., Koirala, S., Bu, L., Xu, L., Hynes, R.O., Walsh, C.A., Corfas, G. & Piao, X. (2008a) GPR56 regulates pial basement membrane integrity and cortical lamination. J. Neurosci., 28, 5817–5826.
- Li, G., Adesnik, H., Li, J., Long, J., Nicoll, R.A., Rubenstein, J.L.R. & Pleasure, S.J. (2008b) Regional distribution of cortical interneurons and development of inhibitory tone are regulated by Cxcl12/Cxcr4 signaling. *J. Neurosci.*, 28, 1085–1098.
- Lidow, M.S. & Song, Z.M. (2001a) Primates exposed to cocaine in utero display reduced density and number of cerebral cortical neurons. J. Comp. Neurol., 435, 263–275.
- Lidow, M.S. & Song, Z.M. (2001b) Effect of cocaine on cell proliferation in the cerebral wall of monkey fetuses. *Cereb. Cortex*, **11**, 545–551.
- Lidow, M.S., Bozian, D. & Song, Z.M. (2001) Cocaine affects cerebral neocortical cytoarchitecture in primates only if administered during neocortical neuronogenesis. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **128**, 45–52.
- Lindhout, D. & Schmidt, D. (1986) In-utero exposure to valproate and neural tube defects. *Lancet*, **1**, 1392–1393.
- Livy, D.J., Miller, E.K., Maier, S.E. & West, J.R. (2003) Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability: effects of binge-like alcohol exposure on the developing rat hippocampus. *Neurotoxicol. Teratol.*, 25, 447–458.
- Lopez-Bendito, G., Lujan, R., Shigemoto, R., Ganter, P., Paulsen, O. & Molnar, Z. (2003) Blockade of GABAB receptors alters the tangential migration of cortical neurons. *Cereb. Cortex*, 13, 932–942.
- Lopez-Bendito, G., Sanchez- Alcaniz, J.A., Pla, R., Borrell, V., Pico, E., Valdeolmillos, M. & Marın, O. (2008a) Chemokine signaling controls intracortical migration and final distribution of GABAergic interneurons.
 J. Neurosci., 28, 1613–1624.
 - Loulier, K., Lathia, J.D., Marthiens, V., Relucio, J., Mughal, M.R., Tang, S.C., Coksaygan, T., Hall, P.E., Chigurupati, S., Patton, B., Colognato, H., Rao, M.S., Mattson, M.P., Haydar, T.F. & Ffrench-Constant, C. (2009) beta1 integrin maintains integrity of the embryonic neocortical stem cell niche. *PLoS Biol.*, 7, e1000176.
 - Magazanik, L.G., Buldakova, S.L., Samoilova, M.V., Gmiro, V.E., Mellor, I.R. & Usherwood, P.N.B. (1997) Block of open channels of recombinant AMPA receptors and native AMPA/kainate receptors by adamantane derivatives. J. Physiol., 505, 655–663.
 - Manent, J.B. & Represa, A. (2007) Neurotransmitters and brain maturation: early paracrine actions of GABA and glutamate modulate neuronal migration. *Neuroscientist*, 13, 268–279.
 - Manent, J.B., Demarque, M., Jorquera, I., Pellegrino, C., Ben-Ari, Y., Aniksztejn, L. & Represa, A. (2005) A non canonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. J. Neurosci., 25, 4755–4765.
 - Manent, J.B., Jorquera, I., Ben-Ari, Y., Aniksztejn, L. & Represa, A. (2006) Glutamate acting on AMPA but not NMDA receptors modulates the migration of hippocampal interneurons. J. Neurosci., 26, 5901–5909.
 - Manent, J.B., Jorquera, I., Mazzucchelli, I., Depaulis, A., Perucca, E., Ben-Ari, Y. & Represa, A. (2007) Fetal exposure to GABAacting antiepileptic drugs generates hippocampal and cortical dysplasias. *Epilepsia*, 48, 684– 693.
 - Manent, J.B., Jorquera, I., Franco, V., Ben-Ari, Y., Perucca, E. & Represa, A. (2008) Antiepileptic drugs and brain maturation: fetal exposure to lamotrigine generates cortical malformations in rats. *Epilepsy Res.*, 78, 131–139.
 - Marın, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M. & Rubenstein, J.L. (2001) Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin/neuropilin interactions. *Science*, 293, 872–875.
 - Martini, F.J. & Valdeolmillos, M. (2010) Actomyosin contraction at the cell rear drives nuclear translocation in migrating cortical interneurons. J. Neurosci., 30, 8660–8670.
 - Martini, F.J., Valiente, M., Lopez Bendito, G., Szabo, G., Moya, F., Valdeolmillos, M. & Marın, O. (2009) Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. *Development*, **136**, 41–50.
 - Mejia-Gervacio, S., Murray, K. & Lledo, P.M. (2011) NKCC1 controls GABAergic signaling and neuroblast migration in the postnatal forebrain. *Neural Dev.*, **6**, 4.
 - Métin, C., Denizot, J.P. & Ropert, N. (2000) Intermediate zone cells express calcium-permeable AMPA receptors and establish close contact with growing axons. *J. Neurosci.*, **20**, 696–708.
 - Métin, C., Baudoin, J.P., Rakić, S. & Parnavelas, J.G. (2006) Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. *Eur. J. Neurosci.*, 23, 894–900.
 - Miller, M.W. (1986) Effects of alcohol on the generation and migration of cerebral cortical neurons. *Science*, **233**, 1308–1311.

- Miller, M.W. & Robertson, S. (1993) Prenatal exposure to ethanol alters the postnatal development and transformation of radial glia to astrocytes in the cortex. J. Comp. Neurol., 337, 253–266.
- Miyoshi, G. & Fishell, G. (2011) GABAergic interneuron lineages selectively sort into specific cortical layers during early postnatal development. *Cereb. Cortex*, **21**, 845–852.
- Mooney, S.M. & Miller, M.W. (2003) Ethanol-induced neuronal death in organotypic cultures of rat cerebral cortex. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 147, 135–141.
- Nadarajah, B. & Parnavelas, J.G. (2002) Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.*, 3, 423–432.
- Nadarajah, B., Jones, A.M., Evans, W.H. & Parnavelas, J.G. (1997) Differential expression of connexins during neocortical development and neuronal circuit formation. J. Neurosci., 17, 3096–3111.
- Nadarajah, B., Brunstrom, J.E., Grutzendler, J., Wong, R.O. & Pearlman, A.L. (2001) Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat. Neurosci.*, 4, 143–150.
- Nagano, T., Yoneda, T., Hatanaka, Y., Kubota, C., Murakami, F. & Sato, M. (2002) Filamin Ainteracting protein (FILIP) regulates cortical cell migration out of the ventricular zone. *Nat. Cell Biol.*, 4, 495–501.
- Nakamura, K., Yamashita, Y., Tamamaki, N., Katoh, H., Kaneko, T. & Negishi, M. (2006) In vivo function of Rnd2 in the development of neocortical pyramidal neurons. *Neurosci. Res.*, 54, 149–153.
- Nasrallah, I.M., McManus, M.F., Pancoast, M.M., Wynshaw-Boris, A. & Golden, J.A. (2006) Analysis of non-radial interneuron migration dynamics and its disruption in Lis1b/- mice. J. Comp. Neurol., 496, 847–858.
- Neddens, J. & Buonanno, A. (2010) Selective populations of hippocampal interneurons express ErbB4 and their number and distribution is altered in ErbB4 knockout mice. *Hippocampus*, **20**, 724–744.
- Niewmierzycka, A., Mills, J., St-Arnaud, R., Dedhar, S. & Reichardt, L.F. (2005) Integrin-linked kinase deletion from mouse cortex results in cortical lamination defects resembling cobblestone lissencephaly. J. Neurosci., 25, 7022–7031.
- Ohtani, N., Goto, T., Waeber, C. & Bhide, P.G. (2003) Dopamine modulates cell cycle in the lateral ganglionic eminence. J. Neurosci., 23, 2840–2850.
- Olney, J.W., Wozniak, D.F., Jevtovic-Todorovic, V., Farber, N.B., Bittigau, P. & Ikonomidou, C. (2002) Glutamate and GABA receptor dysfunction in the fetal alcohol syndrome. *Neurotox. Res.*, 4, 315–325.
- Perucca, E. (2005) Birth defects after prenatal exposure to antiepileptic drugs. Lancet Neurol., 4, 781–786.
- Platel, J.C., Stamboulian, S., Nguyen, I. & Bordey, A. (2010) Neurotransmitter signaling in postnatal neurogenesis: the first leg. *Brain Res. Rev.*, 63, 60–71.
- Polleux, F., Whitford, K.L., Dijkhuizen, P.A., Vitalis, T. & Ghosh, A. (2002) Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development*, **129**, 3147–3160.
- Poluch, S. & Juliano, S.L. (2007) A normal radial glial scaffold is necessary for migration of interneurons during neocortical development. *Glia*, 55, 822–830.
- Poluch, S. & König, N. (2002) AMPA receptor activation induces GABA release from neurons migrating tangentially in the intermediate zone of embryonic rat neocortex. *Eur. J. Neurosci.*, 16, 350–354.
- Poluch, S., Drian, M.J., Durand, M., Astier, C., Benyamin, Y. & König, N. (2001) AMPA receptor activation leads to neurite retraction in tangentially migrating neurons in the intermediate zone of the embryonic rat neocortex. *J. Neurosci. Res.*, 63, 35–44.
- des Portes, V., Francis, F., Pinard, J.M., Desguerre, I., Moutard, M.L., Snoeck, I., Meiners, L.C., Capron, F., Cusmai, R., Ricci, S., Motte, J., Echenne, B., Ponsot, G., Dulac, O., Chelly, J. & Beldjord, C. (1998) doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH). *Hum. Mol. Genet.*, 7, 1063–1070.
- Powell, E.M., Mars, W.M. & Levitt, P. (2001) Hepatocyte growth factor/scatter factor is a motogen for interneurons migrating from the ventral to dorsal telencephalon. *Neuron*, **30**, 79–89.
- Rakic, P. (2007) The radial edifice of cortical architecture: from neuronal silhouettes to genetic engineering. *Brain Res. Rev.*, **55**, 204–219.
- Reinoso, B.S., Undie, A.S. & Levitt, P. (1996) Dopamine receptors mediate differential morphological effects on cerebral cortical neurons in vitro. *J. Neurosci. Res.*, 43, 439–453.
- Riccio, O., Potter, G., Walzer, C., Vallet, P., Szabó, G., Vutskits, L., Kiss, J.Z. & Dayer, A.G. (2009) Excess of serotonin affects embryonic interneuron migration through activation of the serotonin receptor 6. *Mol. Psychiatry*, 14, 280–290.
- Rio, C., Rieff, H.I., Qi, P., Khurana, T.S. & Corfas, G. (1997) Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration. *Neuron*, **19**, 39–50.
- Robert, E. & Guibaud, P. (1982) Maternal valproic acid and congenital neural tube defects. *Lancet*, 2, 937.

- Rudolph, J., Zimmer, G., Steinecke, A., Barchmann, S. & Bolz, J. (2010) Ephrins guide migrating cortical interneurons in the basal telencephalon. *Cell Adh. Migr.*, 4, 400–408.
- Sakata-Haga, H., Sawada, K., Hisano, S. & Fukui, Y. (2002) Administration schedule for an ethanol-containing diet in pregnancy affects types of offspring brain malformations. *Acta Neuropathol.*, **104**, 305–312.
- Sapir, T., Shmueli, A., Levy, T., Timm, T., Elbaum, M., Mandelkow, E.M. & Reiner, O. (2008) Antagonistic effects of doublecortin and MARK2/Par-1 in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.*, 28, 13008–13013.
- Sarkisian, M.R., Frenkel, M., Li, W., Oborski, J.A. & LoTurco, J.J. (2001) Altered interneuron development in the cerebral cortex of the flathead mutant. *Cereb. Cortex*, **11**, 734–743.
 - Schaar, B.T., Kinoshita, K. & 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.
 - Schmid, R.S., Shelton, S., Stanco, A., Yokota, Y., Kreidberg, J.A. & Anton, E.S. (2004) alpha3beta1 integrin modulates neuronal migration and placement during early stages of cerebral cortical development. *development*, **131**, 6023–6031.
 - Schmid, R.S., Jo, R., Shelton, S., Kreidberg, J.A. & Anton, E.S. (2005) Reelin, integrin and DAB1 interactions during embryonic cerebral cortical development. *Cereb. Cortex*, 15, 1632–1636.
 - Sentürk, A., Pfennig, S., Weiss, A., Burk, K. & Acker-Palmer, A. (2011) Ephrin Bs are essential components of the Reelin pathway to regulate neuronal migration. *Nature*, **472**, 356–360.
 - Sheldon, M., Rice, D.S., D'Arcangelo, G., Yoneshima, H., Nakajima, K., Mikoshiba, K., Howell, B.W., Cooper, J.A., Goldowitz, D. & Curran, T. (1997) Scrambler and yotari disrupt the disabled gene and produce a reelerlike phenotype in mice. *Nature*, **389**, 730–733.
 - Shim, S.Y., Wang, J., Asada, N., Neumayer, G., Tran, H.C., Ishiguro, K., Sanada, K., Nakatani, Y. & Nguyen, M.D. (2008) Protein 600 is a microtubule/endoplasmic reticulum-associated protein in CNS neurons. *J. Neurosci.*, 28, 3604–3614.
 - Shu, T., Ayala, R., Nguyen, M.D., Xie, Z., Gleeson, J.G. & Tsai, L.H. (2004) Ndel1 operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning. *Neuron*, 44, 263–277.
 - Soria, J.M. & Valdeolmillos, M. (2002) Receptor-activated calcium signals in tangentially migrating cortical cells. *Cereb. Cortex*, **12**, 831–839.
 - Stanco, A., Szekeres, C., Patel, N., Rao, S., Campbell, K., Kreidberg, J.A., Polleux, F. & Anton, E.S. (2009) Netrin-1-a3b1 integrin interactions regulate the migration of interneurons through the cortical marginal zone. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **106**, 7595–7600.
 - Stumm, R.K., Zhou, C., Ara, T., Lazarini, F., Dubois-Dalcq, M., Nagasawa, T., Höllt, V. & Schulz, S. (2003) CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *J. Neurosci.*, 23, 5123–5130.
 - Tabata, H. & Nakajima, K. (2003) Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. J. Neurosci., 23, 9996–10001.
- Tanaka, T., Serneo, F.F., Higgins, C., Gambello, M.J., Wynshaw-Boris, A. & Gleeson, J.G. (2004a) Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *J. Cell Biol.*, 165, 709–721.
 - Tanaka, T., Serneo, F.F., Tseng, H.C., Kulkarni, A.B., Tsai, L.H. & Gleeson, J.G. (2004b) Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron*, **41**, 215–227.

- Threadgill, D.W., Dlugosz, A.A., Hansen, L.A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., Harris, R.C., Barnard, J.A., Yuspa, S.H., Coffey, R.J. & Magnuson, T. (1995) Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*, 269, 230–234.
- Tissir, F., Wang, C.E. & Goffinet, A.M. (2004) Expression of the chemokine receptor Cxcr4 mRNA during mouse brain development. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **149**, 63–71.
- Tiveron, M.C., Rossel, M., Moepps, B., Zhang, Y.L., Seidenfaden, R., Favor, J., Konig, N. & Cremer, H. (2006) Molecular interaction between projection neuron precursors and invading interneurons via stromal-derived factor 1 (CXCL12)/CXCR4 signaling in the cortical subventricular zone/intermediate zone. J. Neurosci., 26, 13273–13278.
- Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R.E., Richardson, J.A. & Herz, J. (1999) Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell*, 97, 689–701.
- Tsai, J.W., Chen, Y., Kriegstein, A.R. & Vallee, R.B. (2005) LIS1 RNA interference blocks neural stem cell division, morphogenesis, and motility at multiple stages. J. Cell Biol., 170, 935–945.
- Valiente, M. & Marín, O. (2010) Neuronal migration mechanisms in development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 20, 68–78.
- Vitalis, T., Cases, O., Callebert, J., Launay, J.M., Price, D.J., Seif, I. & Gaspar, P. (1998) Effects of monoamine oxidase A inhibition on barrel formation in the mouse somatosensory cortex: determination of a sensitive developmental period. J. Comp. Neurol., 393, 169–184.
- Wafford, K.A., Burnett, D.M. & Leidenheimer, N.J. (1991) Ethanol sensitivity of the GABA-A receptor expressed in Xenopus oocytes requires 8 amino acids contained in the gamma 2L subunit. *Neuron*, 7, 1–20.
- Wang, X.H., Levitt, P., Grayson, D.R. & Murphy, E.H. (1995) Intrauterine cocaine exposure of rabbits: persistent elevation of GABA-immunoreactive neurons in anterior cingulate cortex but not visual cortex. *Brain Res.*, 689, 32–46.
- Wang, X.H., Jenkins, A.O., Choi, L. & Murphy, E.H. (1996) Altered neuronal distribution of parvalbumin in anterior cingulate cortex of rabbits exposed in utero to cocaine. *Exp. Brain Res.*, **112**, 359–371.
- West, J.R., Hamre, K.M. & Cassell, M.D. (1986) Effects of ethanol exposure during the third trimester equivalent on neuron number in rat hippocampus and dentate gyrus. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **10**, 190–197.
- Wilson, P.M., Fryer, R.H., Fang, Y. & Hatten, M.E. (2010) Astn2, a novel member of the astrotactin gene family, regulates the trafficking of ASTN1 during glial-guided neuronal migration. J. Neurosci., 30, 8529–8540.
- Xie, Z., Sanada, K., Samuels, B.A., Shih, H. & Tsai, L.H. (2003) Serine 732 phosphorylation of FAK by Cdk5 is important for microtubule organization, nuclear movement, and neuronal migration. *Cell*, **114**, 469–482.
- Yabut, O., Renfro, A., Niu, S., Swann, J.W., Marín, O. & D'Arcangelo, G. (2007) Abnormal laminar position and dendrite development of interneurons in the reeler forebrain. *Brain Res.*, **1140**, 75–83.
- Yokota, Y., Gashghaei, H.T., Han, C., Watson, H., Campbell, K.J. & Anton, E.S. (2007) Radial glial dependent and independent dynamics of interneuronal migration in the developing cerebral cortex. *PLoS ONE*, 2, e794.
- Zhang, X., Lei, K., Yuan, X., Wu, X., Zhuang, Y., Xu, T., Xu, R. & Han, M. (2009) SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 complexes connect centrosome to the nucleus during neurogenesis and neuronal migration in mice. *Neuron*, 64, 173–187.
II/ Article: "A glial origin for periventricular nodular heterotopia caused by impaired expression of Filamin-A".

Résumé

Les hétérotopies nodulaires périventriculaires (PH) sont des malformations du cerveau chez l'homme suite à des défauts de migration neuronale engendrant la présence de nodules de neurones ectopiques en bordure des ventricules. La plupart des patients présentent des épilepsies et des altérations cognitives plus ou moins importantes. Les mutations dans le gène FLNA (Filamin A) sont la cause majeure des hétérotopies nodulaires périventriculaires ; les mécanismes entrainant ces pathologies restent cependant encore peu connus. Deux lignées de souris knock-out pour le gène FlnA ont été générées, cependant aucune d'entres elles ne présentent de nodule ectopique. Pour mimer la perte de fonction de la protéine FlnA au cours du développement cortical chez le rat, nous avons utilisé une approche par ARN interférent pour inactiver le gène FlnA *in utero* et ainsi reproduire un phénotype d'hétérotopie nodulaire chez le rat comparable à celui observé chez l'homme. Nous avons montré que chez les rats déficients pour le gène FlnA, l'hétérotopie nodulaire résulte d'une désorganisation de la polarité de la glie radiaire dans la zone ventriculaire corticale altérant ainsi la progression des progéniteurs neuronaux dans le cycle cellulaire et la migration des neurones glutamatergiques dans la plaque corticale. Des altérations similaires de la glie radiaire sont également observées dans des cerveaux post-mortem de patients atteints d'hétérotopie nodulaire périventriculaire, présentant de nouvelles mutations, non reportées jusqu'à ce jour, du gène FlnA. Enfin, les jeunes rats déficients pour le gène FlnA sont fortement susceptibles aux épilepsies ce qui confirme la fiabilité de notre modèle animal d'hétérotopie nodulaire périventriculaire. L'ensemble de ces données suggère qu'une désorganisation de la glie radiaire est à l'origine des hétérotopies nodulaires périventriculaires associées à des mutations du gène FLNA.

A glial origin for periventricular nodular heterotopia caused by impaired expression of Filamin-A

Journal:	Human Molecular Genetics
Manuscript ID:	HMG-2011-D-00952
Manuscript Type:	2 General Article - UK Office
Date Submitted by the Author:	23-Aug-2011
Complete List of Authors:	Carabalona, Aurelie; Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, INSERM U901 Beguin, Shirley; Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, INSERM U901 Pallesi-Pocachard, Emilie; Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, INSERM U901 Buhler, Emmanuelle; Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, PPGI Pellegrino, Christophe; Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, INSERM U901 Arnaud, Karen; Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, INSERM U901 HUBERT, Philippe; Hôpital Necker-enfants malades, Réanimation pédiatrique Oualha, Mehdi; Hôpital Necker-enfants malades, Réanimation pédiatrique Khantane, Sabrina; Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, INSERM U901 Coupry, Isabelle; niversite Bordeaux 2, Laboratoire de Génétique Humaine Goizet, Cyril; Hôpital Pellegrin-Enfants, Medical Genetics Bernabe Gelot, Antoinette; Hôpital Trousseau, Laboratoire d'anatomie pathologique REPRESA, Alfonso; Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, INSERM U901 Cardoso, Carlos; Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, INSERM U901
Key Words:	malformation of the cerebral cortex, neuronal migration, radial glia, brain development, in utero RNA interference
	1

SCHOLARONE[™] Manuscripts

Carabalona et al.

A glial origin for periventricular nodular heterotopia caused by impaired expression of Filamin-A

Aurelie Carabalona^{1,2,3}, Shirley Beguin^{1,2,3}, Emilie Pallesi-Pocachard^{1,2,3}, Emmanuelle Buhler^{3,4}, Christophe Pellegrino^{1,2,3}, Karen Arnaud^{1,2,3}, Philippe Hubert⁵, Mehdi Oualha⁵, Sabrina Khantane^{1,2,3}, Isabelle Coupry⁶, Cyril Goizet⁶, Antoinette Bernabe Gelot⁷, Alfonso Represa^{1,2,3} and Carlos Cardoso^{1,2,3*}.

¹Inserm Unité 901, Marseille, 13009, France.

²Université de la Méditerranée, UMR S901 Aix-Marseille 2, 13009, France

³INMED, Marseille 13009, France.

⁴Plateforme postgénomique INMED, INSERM, Parc Scientifique de Luminy, Marseille, France.

⁵Service de réanimation pédiatrique et de néonatologie, Hôpital Necker Enfants Malades, 149 rue de Sèvres Paris, France.

⁶Laboratoire de Génétique Humaine, Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, France.

⁷Département de Neuropathologie, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Hôpital A. Trousseau, Paris, France.

* To whom correspondence should be addressed.

Carlos Cardoso, PhD

INMED, INSERM U901, Parc Scientifique de Luminy, BP13, 13009 Marseille, France Tel: +33 491 82 81 30; Fax: +33 491 82 81 01; Email: <u>cardoso@inmed.univ-mrs.fr</u>

Rattus norvegicus Flna mRNA [GenBank accession number: FJ416060]

ABSTRACT

Periventricular nodular heterotopia (PH) is a human brain malformation caused by defective neuronal migration that results in ectopic neuronal nodules lining the lateral ventricles beneath a normal appearing cortex. Most affected patients have seizures and their cognitive level varies from normal to severely impaired. Mutations in the Filamin-A (or FLNA) gene are the main cause of PH, but the underlying pathological mechanism remains unknown. Although two FInA knockout mouse strains have been generated, none of them showed the presence of ectopic nodules. To recapitulate the loss of FInA function in the developing rat brain, we used an in utero RNA interference-mediated knockdown approach and successfully reproduced a PH phenotype in rats comparable to that observed in human patients. In FInAknockdown rats, we report that PH results from a disruption of the polarized radial glial scaffold in the ventricular zone altering progression of neural progenitors through the cell cycle and impairing migration of neurons into the cortical plate. Similar alterations of radial glia are observed in the post-mortem brain of a female patient with PH and severe congenital heart and lung disease harboring a novel FLNA frameshift mutation (R2103QfsX56). Finally, juvenile FInA-knockdown rats are highly susceptible to seizures confirming the reliability of this novel animal model of PH. Our findings reveal that the disorganization of radial glia is the leading cause of PH pathogenesis associated with FLNA mutations.

Carabalona et al.

INTRODUCTION

Congenital malformations of the cerebral cortex are important causes of mental retardation and account for 20-40% of drug-resistant epilepsy in childhood (1). Among these cortical malformations, periventricular nodular heterotopia (PH) represents a clinically and genetically heterogeneous group of neuronal migration disorders. PH is characterized by nodules of neurons ectopically placed along the walls of the lateral ventricles (2,3). PH, often bilateral, occured predominantly in women as an X-linked dominant trait associated with high rates of prenatal hemizygous male lethality (2,4,5). Mutations in the Filamin-A (or FLNA) gene, on Xq28, were found in 100% of families with X-linked bilateral PH and in 26% of sporadic patients with PH (4,6). The low percentage of FLNA mutations in sporadic cases could be explained by low somatic mosaicism (7), as well as the viability of some affected males (5,8). Heterozygous women present seizures that are difficult to control and normal to borderline intelligence (4,5). FLNA is widely expressed in brain as well as in many other tissues and encodes a large (280 kDa) cytoplasmic actinbinding phosphoprotein (9). Dimerization of FLNA protein allows the formation of a Vshaped flexible structure which crosslinks actin filaments into orthogonal networks (10). It also regulates reorganization of the actin cytoskeleton by interacting with several proteins at the plasma membrane leading to changes in cell shape and migration (11). Accordingly, a FLNA-deficient human melanoma cell line shows motility defects (12) suggesting that PH in humans likely results from disruption of neuronal migration during cortical development. The high prevalence of FLNA mutations resulting in truncations of the actin-binding domain (6) indicates that FLNA's ability to crosslink actin may be essential for neuronal migration. Thus, expression of FInA lacking the actin-binding domain in the mouse neocortex leads to

neuronal migration arrest in the subventricular (SVZ) and intermediate zones (IZ) (13). In contrast, complete loss of FInA in mice, which results in embryonic lethality (14,15) fails to reveal the presence of misplaced neurons in the neocortical VZ/IZ (14). Genetic compensation may account for the fact that FInA-null mice generated so far do not exhibit PH (14,15). Thus, development of a more appropriate FInA animal model could improve our understanding of mechanisms underlying the genesis of PH.

To address this limitation, we used an in utero RNA interference (RNAi)mediated knockdown approach (16) to recapitulate the loss of function of FInA in the developing rat brain. This method has proved very powerful to develop animal models of brain disorders involving similar proteins and mechanisms to that observed in human patients (17,18) Moreover, in vivo RNAi allows fast and spatio-temporal modulation of gene expression that presents considerable advantages compared to classical genetically modified rodent models. Here, we show that in utero knockdown of FInA expression in newborn cortical neurons impairs their cell cycle progression as well as their migration by disrupting the organization of radial glia and give rise to a PH phenotype in the rat neocortex. Consistent with the observations made in rodents, similar alterations in radial glial organization are observed in a post-mortem brain of a female patient with PH carrying an unreported frameshift mutation FLNA. Finally, we validate our new animal model of PH by showing that juvenile FInAknockdown rats display a higher susceptibility to pentylenetetrazol-induced seizures. Overall, our data highlight the critical role of FLNA in radial glia organization and function for neurogenesis and migration and also provided insight into the molecular pathogenesis of human PH.

RESULTS

Expression of FInA in the developing rat brain

To assess how FInA contributes to cortical development, we examined the spatial and temporal expression patterns of FInA in rat neocortex. Western-blot analysis of whole brain protein extracts, from embryonic day 13 (E13) to postnatal day 30 (P30) rats, showed that FInA was expressed at all embryonic stages but markedly reduced after P11 (Fig. 1A). Moreover, immunohistochemical stainings revealed strong labeling of FInA in the VZ/IZ of the rat neocortex at E14, when neuronal migration is underway (Fig. 1B and C). By E20, when neuronal migration is largely completed, expression of FInA was restricted to the ventricular zone (Fig. 1D and E) and persisted in the periventricular region until P7 (Fig. 1F and G). Altogether, these findings suggested that FInA is specifically expressed in the VZ at embryonic stages, and decreases during postnatal development. Moreover, our data are consistent with previous studies showing the expression of FInA in the developing mouse neocortex (9).

In utero RNAi of FInA impairs radial migration

To further explore the function of FInA in corticogenesis, we used the *in utero* RNAi approach to knockdown FInA expression in rat embryonic neuronal progenitor cells. For this purpose, we generated two small-hairpin RNAs (shRNAs) targeting either the coding sequence (CDShp) or the 3'-untranslated region (3UTRhp) of the rat FInA mRNA (Fig. 2A) and the two corresponding ineffective shRNAs with three point mutations creating mismatches, CDSm3hp and 3UTRm3hp. These shRNAs were transiently transfected into rat C6 glioma cells to evaluate their capacity to repress endogenous FInA expression. We found that CDShp and 3UTRhp, but not the two

ineffective shRNAs, significantly decreased FInA mRNA levels by 60%-70% resulting in a notable reduction in FInA protein as assessed by western-blot analysis (Fig. 2B and C). To determine whether knockdown of FInA expression alters neuronal migration, 3UTRhp or 3UTRm3hp combined with a RFP construct were introduced into neural progenitor cells of rat neocortex by in utero electroporation at E15. This time of development corresponds to the period of migration of layers II/III neurons and the highest levels of FInA expression in the cortex (Fig. 1A). The distribution of RFP-positive cells was analyzed two and five days later (Fig. 2D and F). At E17, cells transfected with the RFP construct alone (78.5 \pm 4.7%; n = 11 embryos) or combined with 3UTRhp (87.4 \pm 3.6%; n = 9 embryos) or 3UTRm3hp (73.8 \pm 5.2%; n = 8 embryos) were largely found in the VZ/IZ (Fig. 2D and E). However, in the upper IZ of 3UTRhp transfected brains (n = 10), we found a significantly higher percentage of non-radially RFP-positive cells with a bipolar morphology compared to control brains transfected with RFP alone (n = 10) or together with 3UTRm3hp (n = 10) (Supplementary Material, Fig. S1). By E20, the majority of RFP (90.1 ± 2.14%; n = 10 embryos) or 3UTRm3hp (81.4 \pm 2.3%; n = 9 embryos) transfected cells reached the cortical plate (Fig. 2F and G). In contrast, the expression of 3UTRhp led to a significant arrest of transfected cells in the VZ/IZ, with only $32.4 \pm 3.9\%$ (n = 12) embryos; P<0.001) of RFP-positive cells reaching the cortical plate (Fig. 2F and G). To rule out the possibility that this phenotype was due to off-target effects of 3UTRhp, we first conducted similar experiments with CDShp construct (n = 4 embryos) and the same migration defect was observed (Supplementary Material, Fig. S2). We next performed a rescue experiment in which we co-transfected the 3UTRhp along with a FInA-IRES-GFP construct driving the expression of the full-length rat FInA coding sequence (GenBank accession no. FJ416060) and GFP as a reporter (Supplementary Material, Fig. S3). Expression of FInA-IRES-GFP alone did not affect

Carabalona et al.

neuronal migration (Fig. 3A-C) and prevented migration arrest of transfected cells in the VZ when co-expressed with 3UTRhp (Fig. 3D-F). This rescue confirmed the specificity of our FInA knockdown experiments. Altogether, these results support an involvement of FInA in radial neuronal migration during cortical development.

FInA-knockdown rats exhibit periventricular nodular heterotopia

In order to evaluate if this impaired neuronal migration leads to PH formation, we examined postnatal brains following embryonic knockdown of FInA expression. We found ectopic nodules of RFP-positive cells lining the ventricular wall in all 3UTRhp transfected brains examined at P7 (n = 13; Fig. 4B) or at P30 (n= 9; data not shown) compared to controls (n= 15; Fig. 4A). In all P7 FInA-knockdown pups, the average nodule size ranged from 0.17 to 0.37 mm² (Fig. 4C). They contained a mixture of RFP transfected and non-transfected cells, which were positive for the mature neuronal markers NeuN (marker of neuronal nuclei), CDP (cortical upper layers), FoxP2 (cortical deeper layers), GABA (interneurons) and the astroglial marker S100β (Fig. 4D-I). Similar cellular constituents have also been found in nodules from postmotem human PH brains with FLNA mutations (19-21).

Disruption of radial glia in FInA-knockdown rats

Radial glia play a critical role in the construction of the cerebral cortex by providing a scaffold for radial migration of new neurons to their target locations (22). Therefore, we investigated the influence of FInA knockdown on radial glia organization. Brains transfected with RFP alone or together with 3UTRhp were immunostained two and five days post-electroporation with the radial glial marker vimentin. In most of E17 and in all E20 FInA-knockdown brains, but not in age-matched controls, we observed a disruption of radial glial fibers in the VZ/SVZ, where RFP-positive cells accumulate

forming heterotopia (Fig. 5A-H). To further examine the role of FInA in radial glial cells, in utero RNAi experiments were performed with a brain lipid-binding protein (BLBP) promoter GFP construct specific for those cells. In control brains (n = 10), electroporated at E15 and examined two days later, GFP-positive cells displayed the characteristic features and polarized morphology of radial glia with processes extending from the VZ to the pial surface (Fig. 5I). In contrast, in age-matched FInAknockdown brains (n = 10), $9.39 \pm 2.03\%$ of GFP-positive cells (P<0.001) exhibited misoriented apical processes (Fig. 5J and K). However, pial processes remained intact (data not shown). Apical endfeet of radial glial cells form an adhesive lining at the VZ (23) thus defects in this structure could contribute to PH formation. Furthermore, β 1-integrins are involved in radial glial endfeet anchoring to the ventricular surface (24.25). These anchors are reinforced by cadherin-catenin based adherens junctions, which attach apical endfeet of adjacent radial glial cells to each other to maintain the neuroepithelial integrity of the VZ (23). We therefore examined whether there was an alteration of the neuroepithelial lining in FInA-knockdown brains, two and five days post-electroporation, by β 1-integrin and β -catenin immunostainings. At E17, we detected alterations in the neuroepithelial lining in most of FInA-knockdown brains as indicated by a discontinuity in β -catenin and β 1-integrin stainings in the VZ (Fig. 5N and O). In comparison, in all age-matched controls, the VZ was characterized by tight cell-associations (Fig. 5L and M). Disruption of the neuroepithelial lining was even more marked below the heterotopia in the majority of E20 FInA-knockdown brains (Fig. 5P-S). Our data suggest that disruption of both polarized radial glial scaffold and neuroepithelial lining were the likely cause of the failure of some neurons to migrate away from the VZ and forming PH.

Role of FInA in neural progenitor cell proliferation

In addition to providing guidance, radial glia also function as neural progenitors giving rise to most cortical neurons (26,27). To study the effect of FInA knockdown during neural progenitor cell cycle progression, brains that were transfected at E15 with RFP alone or combined with 3UTRhp or 3UTRm3hp were stained 48 hours postelectroporation for the proliferation marker Ki-67. In control brains transfected with RFP alone (n = 7) or together with 3UTRm3hp (n = 5), $38.4 \pm 4.3\%$ or $37.3 \pm 5.9\%$ of RFP-expressing cells in the VZ were Ki67 positive, respectively (Fig. 6A, C and D). Surprisingly, the percentage of Ki67-positive cells in 3UTRhp transfected brains (15.9) \pm 2.9%, n = 5) was significantly decreased (P<0.01) (Fig. 6B and D). Similar results were obtained with the anti-phosphovimentin antibody 4A4, which labels M-phase neural progenitor cells. Indeed, we found in 3UTRhp brains (n= 9) that only 12.4 ± 2.1% (P<0.05) of transfected cells were positive for 4A4 compared to control brains transfected with RFP (27.4 \pm 7.1 %; n = 6) or 3UTRm3hp (28.1 \pm 4.8%; n = 6) (Fig. 6E-H). These data indicate that knockdown of FInA impaired progression of neural progenitors through the cell cycle. To determine whether this effect induced a premature neuronal differentiation, we examined the proportion of electroporated cells in the VZ at E15 that expressed the early pan-neuronal marker class III β-tubulin (TuJ1) two days later. Whereas in control brains (RFP; n = 3 or 3UTRm3hp; n = 3) none of the transfected cells in the VZ were positive for TuJ1, we observed that 5.3 ± 2% (P<0.05) of RFP-positive cells co-expressed TuJ1 in 3UTRhp transfected brains (n = 3) (data not shown). Alteration in neural progenitor cell cycle progression induced by FInA knockdown could also result in an increase of cell death. To investigate this issue, 3UTRhp transfected brains were immunostained for cleaved caspase-3. No obvious change in cell death was noted between 3UTRhp transfected brains (n = 3) and control brains (n = 3); data not shown). Taken together, these

experiments uncovered an unknown function for FInA in regulating cell cycle progression of cortical neural progenitors.

FLNA-related PH in humans results from alterations of radial glia

To evaluate if, in humans, FLNA-related PH resulted from alterations in radial glia organization and function, we investigated a post-mortem brain of a female patient harboring a FLNA mutation. She presented severe congenital heart and lung disease and died from respiratory distress at three months of age. Neuropathological analysis showed the presence of bilateral PH (Fig. 7A and B). Sequencing of FLNA revealed a cytosine insertion at nucleotide 6306 in exon 39, causing a translational frameshift that introduced 56 novel amino-acids before premature termination (R2103QfsX56) (Fig. 7C). This unreported FLNA mutation is predicted to delete the C-terminal dimerizing domain as well as the β -class integrins interaction domains. Because most ependymal cells are derived from radial glia (28), we assessed the neuroependymal integrity in our patient. We found that heterozygous-loss of FLNA disrupted the neuroependymal lining as revealed by the altered distribution of vimentin (Fig. 7F and G) and GFAP (data not shown) at the ventricular surface. Moreover, it induced the loss of ependymal cells in regions immediately below PH (Fig. 7G and K), the few remaining cells being strongly labelled by β 1-integrin (Fig. 7J and K). In constrast, in age-matched control brain, vimentin (Fig. 7D and E) and GFAP (data not shown) staining highlighted the neuroependyma lining characterized by tight cell-associations with β 1-integrin labelling restricted to the basal membrane of vessels (Fig. 7H and I). Additionally, around PH in the patient (Fig. 7F) but not in the control (Fig. 7D), we identified vimentin-immunopositive fibers that resemble radial glial processes. Our findings suggest that the presence of these fibers around PH and disruption of

neuroependyma are probably due to alterations of radial glia function and further maturation into ependymal cells. Overall, these observations are reminiscent of the phenotype of FlnA-knockdown rats.

FInA-knockdown rats display increased susceptibility to pentylenetetrazol induced seizures

Epilepsy is the main presenting symptom of patients with PH due to FLNA mutations (6). Therefore, we investigated if FInA-knockdown rats displayed an increased susceptibility to seizures. One of the commonly used behavioral way to study brain excitability is the application of pentylenetetrazol (PTZ), which is a chemical convulsant that induce seizures by blocking the GABAA receptor-coupled chloride ionophore (29). Thus, FlnA-knockdown rats at P30 and age-matched control rats (transfected with RFP alone) were intraperitoneally injected with subconvulsive doses of PTZ (25 mg/kg) every ten minutes. Injections of PTZ were continued until each rat had a generalized tonic-clonic seizure. Generalized seizures in the FInA-knockdown rats (n = 11) occurred at significantly lower doses of PTZ (Fig. 8A) and with significantly shorter latencies (Fig. 8B) than they did in controls (n = 9; Fig. 8A and B). In addition, three out of eleven FInA-knockdown rats died after seizures (Fig. 8C). Next, these animals were processed for histological analyses in order to detect ectopic nodules. Immunohistochemical analysis were performed on coronal brain sections with neuronal markers (NeuN, CDP, FOXP2 and GABA) and a glial-specific marker (S100 β). This allowed us to confirm the presence of heterotopic neurons dispersed or organized into nodules (larger than 0.17 mm²) adjacent to the lateral ventricular wall in FInA-knockdown brains. Then, we investigated whether there was a correlation between the PH size and susceptibility to seizures. Though, all FInAknockdown rats displayed PTZ-induced seizures, we found no correlation between

their occurence and the extent of PH (data not shown). Finally, our data suggest that lowered seizure threshold in FInA-knockdown rats results from the presence of PH.

Carabalona et al.

DISCUSSION

In this study, we show that embryonic knockdown of FInA impairs radial migration by influencing cell cycle progression, radial glia organization and neuronal orientation in the upper intermediate zone. We also demonstrate that PH, in postnatal brains, resulted from both cell-autonomous and non-cell autonomous effects of FInA knockdown. Specifically, numerous non-transfected neurons and glial cells were observed within the ectopic nodules. Our findings indicate that defective neuronal migration alone is not sufficient to account for all of the hallmarks of PH and that pathogenesis might result from a disruption of the polarized radial glial scaffolding. Consistently, we found alterations in radial glia organization around FLNA-related PH in rats and humans. Moreover, similar disruption of radial glia organization has been previously observed in five human fetuses with PH from unknown etiology suggesting that this feature may represent a common pathogenic mechanism of PH (30).

Radial glia are highly polarized cells that play an essential role during cortical development through their function as neural progenitors and guides of neuronal migration (22,23). Polarized radial glial cells are characterized by a pear-shaped cell soma in the VZ, with a short apical process that forms an endfoot anchored to the ventricle and a long, slender basal process extending to the pial surface (31). The basal process serves as a scaffold for the migration of newborn neurons (32). In contrast, the apical processes of adjacent radial glial cells are attached to one another via adherens junctions to maintain their apical attachment and the neuroepithelial integrity of the VZ (23). Adherens junctions are multiprotein complexes composed of cadherins and α - and β -catenin. The latter binds to the cadherin cytoplasmic domain and provides a connection to the actin cytoskeleton by

interacting with α -catenin (33). Apical adherens junctions are also necessary for the establishment of the apical-basal polarity in radial glial cells (34). In addition β 1integrin proteins, through their interaction with laminin α -2 chain which serve as ligands for integrins in the extracellular matrix, reinforce radial glial apical endfeet anchoring at the ventricular surface (35). A recent study has shown that inhibition of β 1-integrin function at the VZ results in apical endfeet detachment (25). Although we found that FInA is specifically expressed in the VZ during embryonic cerebral cortical development, its function in radial glial apical endfeet adhesion remains unclear. It has been shown that β 1-integrin mediated cell adhesion to the extracellular matrix is dependent on the binding of FLNA to vimentin and protein kinase-C epsilon (PKC ε) (36). The formation of this multiprotein complex allows vimentin phosphorylation by PKC ε (37,38). This step is crucial for the activation and trafficking of β 1-integrin to the plasma membrane but also for cell migration (37,39). Indeed, fibroblasts obtained from PKCE-knockout mice exhibit defective cell adhesion and motiliy (40). Similarly knockdown of FLNA in HEK cells abrogated vimentin phosphorylation and reduced cell surface β1-integrin expression (36). Based on these observations, alterations of the FLNA/β1-integrin pathway may contribute to PH pathogenesis. Supporting this proposed mechanism, we found that fibroblast lysates of patients with PH and FLNA mutation showed lower levels of phosphorylated vimentin (data not shown). More interestingly, we showed that the distribution of β 1-integrin was altered at the ventricular surface in FInA-knockdown rats and in our PH patient whose identified R2103QfsX56 mutation is predicted to alter FLNA/B1-integrin interaction (41). Consequently, the loss of the polarized localization of β 1-integrin as well as β -catenin affects neuroepithelial lining integrity in regions immediately below PH. These data, consistent with previous studies (14,21), support a major role of FLNA in cell-cell

Human Molecular Genetics

Carabalona et al.

adhesion and polarity of radial glial cells. Futhermore, we observed that the FLNA frameshift mutation identified in our PH patient influences the adhesiveness of radial glial endfeet and the transition from radial glial cells to adult ependymal cells leading to neuroependymal disruption. Indeed, it has been shown that radial glial cells retract their basal process but retain adherens junctions to form the lining of the postnatal ventricles as ependymal cells (28). Taken together, these findings suggest that FLNA is important for the development and the maintenance of the radial glial scaffold during corticogenesis.

In addition to their structural role, radial glial cells also function as neuronal progenitors (26) and have been identified as a major source of neurons during development (27). Radial progenitors can either divide symmetrically to self-renew or divide asymmetrically to produce another radial progenitor and either a neuron or an intermediate progenitor daughter cell (IPCs) (42,43). While radial progenitors divide at the apical surface of the VZ, IPCs populate the overlying SVZ where they divide symmetrically to generate neurons for the upper cortical layers (43). To our surprise, we found that knockdown of FInA expression in cortical progenitors leads to premature cell cycle exit and significant increase in the proportion of newly generated neurons. Consistent with this observation, FInA-null mutant mouse embryonic stem cells or cortical neural progenitors are also able to differentiate into neurons in vitro (14). From our data, alterations in cell proliferation following knockdown of FInA are most likely due to disruption of radial glial cells adhesion. This hypothesis is supported by several studies showing that disruption of apical adherens junctions between radial glial cells can result in defects in cell proliferation. Indeed, inactivation of α E-catenin or β -catenin signaling in the developing nervous system disrupt adherens junctions and cause cortical progenitor cells to prematurely exit the cell cycle and differentiate into neurons (44,45). Our results showed a discontinuous

staining of β -catenin in the VZ of FlnA-knockdown brains, however a direct association of FLNA with β -catenin has never been characterized. Interestingly, a recent study showed that the RhoA protein, a FLNA partner, is essential for the maintenance of adherens junctions and constrained proliferation of neural progenitors in the developing mammalian brain (46). Based on these findings, we propose that disruption of adherens junctions following FlnA knockdown may results in neural progenitor cells delaminating from the VZ and exiting from the cell cycle.

Approximately 88% of PH patients with FLNA mutations have focal epilepsy, which can begin at any age (6). The seizures may range in severity from mild, with rare frequency and remission without need of antiepileptic drugs, to intractable (6). Functional MRI studies suggest that PH can be functionally integrated in complex circuits and participate, for example, in motor activity (47). Depth electrodes studies also showed the presence of complex circuits which underlie simultaneous seizure initiation within periventricular nodules and, at a distance, in the neocortex (48,49). Thus, progress in our understanding of mechanisms underlying epilepsy requires employment of an appropriate FInA animal model. Though two FInA knockout mice strains have been developed, progress has been hindered by the fact that none of them were epileptic and showed the presence of ectopic nodules (14,15). In contrast, in utero knockdown of FInA expression has succeeded in reproducing a PH phenotype in rat similar to the one observed in human patients. Moreover, all juvenile FInA-knockdown rats displayed an increased susceptibility to convulsive agents regardless of the extent of PH and even a few heterotopic neurons are sufficient to yield epilepsy. These observations are in agreement with previous clinical studies in patients with FLNA mutations that revealed no correlation between the extent of PH and epilepsy severity (6,50).

Human Molecular Genetics

Carabalona et al.

In summary, we have developed the first FInA animal model reliably producing PH improving our understanding of the molecular mechanism underlying heterotopia formation. Indeed, the mechanism of PH formation was originally seen as a defect in neuronal migration. Here, we provide evidence that impaired expression of FLNA in rodents and in humans leads to disruption of the polarized radial glial scaffold in the ventricular zone impairing radial glia functions as neural progenitors and guides of neuronal migration and giving rise to ectopic neuronal nodules. Moreover, we confirmed the reliability of this new model of PH by showing that juvenile FInA-knockdown rats are highly susceptible to seizures. Thus, this animal model provides an unique opportunity to investigate the role of FLNA-related PH in the generation of seizures and therapeutic prospects.

MATERIALS AND METHODS

RNAi constructs

RNA interference experiments were conducted with two shRNAs targeting the coding sequence (CDShp; nucleotides 5963-5983) or the 3'UTR (3UTRhp; nucleotides 8269-8290) of rattus norvegicus *Flna* mRNA (Genbank accession number FJ416060). These constructs were designed using the siRNA Target Designer software (http://www.promega.com/siRNADesigner/program). BLAST searches against rat databases confirmed the specificity of each target. As negative controls, we used two corresponding non-targeting shRNAs (CDSm3hp and 3UTRm3hp) with the same nucleotide sequence except in three positions. These shRNAs were subcloned into a mU6pro vector (gift from Dr. LoTurco J). For rescue experiments, we subcloned the coding sequence of rat FlnA cDNA without the UTRs into the pCAGIG vector (Addgene).

Cell culture and immunocytochemistry

Rat C6 glioma cells were maintained at 37°C in a humidified 5% CO2 incubator in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% FBS, 1mM L-Glutamine and D-Glucose. Cells were transfected with the Neon Transfection System (Invitrogen) or the Combimag reagent (OZ-Biosciences) according to the manufacturer's protocol and postfixed in Antigenfix solution (Diapath). Cells were blocked for 1 hour at RT with 5% normal goat serum, 0.3% Triton X-100 in PBS and were incubated overnight with FlnA antibody (Santa-Cruz, 1/500) at 4°C. Cells were analyzed on a laser-scanning confocal microscope (FluoView 300; Olympus).

RT-PCR and qPCR

Total RNA was isolated from C6 cells using RNeasy-Plus Mini kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen). cDNA was synthesized using the Quantitect Reverse Transcription kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen). Quantitative PCR was performed using oligonucleotides specific for *rattus norvegicus FlnA* (Qiagen, QT00374458) and *cyclophilinA* (Qiagen, QT00177394) as a control probe. Amplification was done using SYBR Green chemistry (Roche diagnostics) and Roche amplification technology (Light Cycler 480). All experiments were performed in triplicate.

Western-blot analysis

Cells were lysed in a buffer (150mM NaCl, 50mM Tris-HCL pH=8.0, 50mM NaF, 0.5% Nonidet P40, 2mM EDTA, protease inhibitor cocktail) at 4°C before proteins were heat denatured and processed by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and immunoblotted with the following primary antibodies: FlnA (Santa-Cruz, 1/1000), α -Tubulin (Sigma, 1/1000) and GFP (Chemokin, 1/5000). The proteins were detected with the western lumilight kit chemiluminescence reagent (GE Healthcare).

In utero electroporation

Wistar rats (Janvier, France) were mated, cared for and used in our animal facilities in agreement with the European Union and French legislations. Timed pregnant rats (E15; E0 was defined as the day of confirmation of sperm-positive vaginal plug) were anesthetized with a mixture of ketamine/xylazine (respectively at 100 mg/kg and 10 mg/kg). The uterine horns were exposed, and a lateral ventricle of each embryo injected using pulled glass capillaries and a microinjector (Picospritzer II;

General Valve Corporation, Fairfield, USA) with Fast Green (2 mg/ml; Sigma, St. Louis, MO) combined with the following DNA constructs: $0.5 \ \mu g/\mu l$ pCAGGS-red fluorescent protein (RFP) either alone or with $1.5 \ \mu g/\mu l$ of shRNA construct targeting the *FlnA* mRNA. Plasmids were further electroporated by discharging a 4000 μ F capacitor charged to 50 V with a BTX ECM 830 electroporator (BTX Harvard Apparatus, Holliston, MA). The voltage was discharged in 5 electrical pulses at 950 ms intervals via 5 mm electrodes placed on the head of the embryo across the uterine wall. We performed *in utero* electroporation in embryonic rats at E15 corresponding to an active period of both radial and tangential migration of newborn neurons in the cortex.

Neuropathological procedures

Neuropathological analyses were performed on two infant brains (3 months-old) in accordance with French Law. Brains were removed 24 hours after death and fixed in 10% (v/v) formaldehyde solution containing NaCl (9 g/l) and ZnSO₄ (3 g/l) for a variable time (depending on brain volume) of at least 6 weeks. After macroscopic examination, selected blocks were paraffin embedded, and 7 μ m slices were stained with hematoxylin, cresyl violet and luxol fast blue. Immunohistochemistry was performed using a Ventana BenchMark XT immunostainer with the following antibodies: Vimentin (Novocastra), β 1-integrin/CD29 (Epitomics, 1/50) and GFAP (Dako). Sections were imaged on a microscope (Nikon, Eclipse E800).

Immunohistochemistry

Rat brains were fixed (E17 or E20) or perfused (P7) with Antigenfix solution and sliced at $100\mu m$ on a vibratome (Microm). Slices were blocked at RT for 1h with 5%

Carabalona et al.

normal goat serum, 0.3% Triton X-100 in PBS and incubated overnight at 4°C with the appropriate antibody for cell proliferation: Ki-67 (Chemicon, 1/300) and 4A4 (Phosphorylated-Vimentin-Ser55; MBL, 1/200); for neuronal differentiation: TuJ1 (β-III tubulin; Promega, 1/6000), FOXP2 (Abcam, 1/4000), CDP (M-222 Santa-cruz, 1/200),Neu-N (Millipore, 1/300), GABA (Sigma, 1/8000), glial marker S100β (EP1576Y Abcam, 1/1000) and Vimentin (Millipore, 1/300); for neuroependymal lining: FInA (Epitomics, 1/1000), β-catenin (Transduction laboratories, 1/300 and β 1-integrin (12G10 Millipore, 1/100); for cell death: Caspase3-Asp175 (Cell signaling, 1/200). Sections were imaged on a laser-scanning confocal microscope (FluoView 300; Olympus).

Quantitative analysis

Quantification was performed with the eCELLence software (<u>www.gvt.it/ecellence</u>) on E17 and E20 coronal sections (100 μ m) located in the dorso-lateral neocortex. Relative positions of transfected cells were estimated by counting RFP-positive cells in 8 areas of interest normalized in individual sections to fit within the whole thickness of the cortex. The latter was divided in three main regions corresponding to the ventricular zone (strata 1 and 2), the intermediate zone (strata 3 to 5) and the cortical plate (strata 6 to 8). P7 coronal sections (100 μ m) were analysed with ImageJ software 1.44j. The nodule size was estimated in square-pixel with the ImageJ polygon tool and converted to mm². In the defined area, using the ImageJ plugin Cell Counter, we calculated the number of transfected and non-transfected cells that were positive for NeuN, CDP, FOXP2, GABA and S100 β markers. For cell-cycle progression, we counted the number of RFP-positive and RFP/KI67 or RFP/4A4 positive cells in a defined area of 0.21 mm² within the ventricular and subventricular

zones (Adobe photoshop-CS3). For orientation analysis, we estimated the number of cells oriented between 0°-45° and 45°-90° in a defined area of 0.21 mm² within the intermediate zone (Adobe photoshop-CS3).

Seizures induction with pentylenetetrazole

To evaluate the susceptibility to seizures in controls rats (RFP-transfected brains) and in FLNA-knockdown animals at P30, pentylenetetrazole (PTZ, 25mg/kg; Sigma) was administered via intraperitoneal injections. PTZ was administered every 10 minutes until generalized seizures occurred. Rats were placed in a plexiglass cage and the time to the onset of the generalized seizure was video-recorded. There was no significant difference in weight or sex-ratio between groups of animals. Experiments were blind: the phenotype of animals was established by morphological analysis after PTZ-induction.

Statistical data

Statistical analysis was performed with SigmaStat (Systat Software). A two-sample Student's t-test was used to compare means of two independent groups if distribution of the data was normal. When the normality test failed, the non-parametric Mann-Whitney test was used. The one-way anova All-Tukey Test was used to compare multiple groups.

Carabalona et al.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr. Manent J.B., Dr. Colonnese M. and Pr. Dudley K. for critical readings and input in our manuscript. We gratefully acknowledge the help of Dr. Françoise Watrin, Scientific Manager of PPGI Platform and Dr. François Michel, Scientific Adviser of INMAGIC Platform. This work was supported by funding from INSERM, ANR (ANR-06-NEURO-08-01 contract number RPV06055ASA), European Union 6th framework thematic priority Life sciences, Genomics and Biotechnology for Health (EPICURE-contract number: LSH-CT-2006-037315) and the Federation des Maladies Orphelines (FMO). A.C. is supported by a PhD fellowship from Provence-Alpes-Côte d'Azur region and INSERM.



REFERENCES

- 1. Kuzniecky, R.I. and Jackson, G.D. (2005) *Magnetic Resonance in Epilepsy.* 2nd *edition Burlington, Elsevier.*
- Ekşioğlu, Y.Z., Scheffer, I.E., Cardenas, P., Knoll, J., DiMario, F., Ramsby, G., Berg, M., Kamuro, K., Berkovic, S.F., Duyk, GM. *et al.* (1996). Periventricular heterotopia: an X-linked dominant epilepsy locus causing aberrant cerebral cortical development. *Neuron*, **16**, 77-87.
- Barkovich, A.J., Kuzniecky, R.I., Jackson, G.D., Guerrini, R. and Dobyns, W.B. (2005). A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurology*, **65**, 1873-1887.
- Fox, J.W., Lamperti, E.D., Ekşioğlu, Y.Z., Hong, S.E., Feng. Y., Graham, D.A., Scheffer, I.E., Dobyns, W.B., Hirsch, B.A., Radtke, R.A. *et al.* (1998). Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron*, **21**, 1315-1325.
- Sheen, V.L., Dixon, P.H., Fox, J.W., Hong, S.E., Kinton, L., Sisodiya, S.M., Duncan, J.S., Dubeau, F., Scheffer, I.E., Schachter, S.C. *et al.* (2001). Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 1775-1783.
- Parrini, E., Ramazzotti, A., Dobyns, W.B., Mei, D., Moro, F., Veggiotti, P., Marini, C., Brilstra, E.H., Dalla Bernardina, B., Goodwin, L. *et al.* (2006). Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin A mutations. *Brain*, **129**, 1892-1906.
- 7. Parrini, E., Mei, D., Wright, M., Dorn, T. and Guerrini, R. (2004). Mosaic mutations of the FLN1 gene cause a mild phenotype in patients with

periventricular heterotopia. Neurogenetics, 5, 191-196.

- Guerrini, R., Mei, D., Sisodiya, S., Sicca, F., Harding, B., Takahashi, Y., Dorn, T., Yoshida, A., Campistol, J., Krämer, G. *et al.* (2004). Germline and mosaic mutations of FLN1 in men with periventricular heterotopia. *Neurology*, **63**, 51-56.
- Sheen, V.L., Feng, Y., Graham, D., Takafuta, T., Shapiro, S.S. and Walsh, C.A. (2002). Filamin A and Filamin B are co-expressed within neurons during periods of neuronal migration and can physically interact. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 2845-2854.
- Nakamura, F., Osborn, T.M., Hartemink, C.A., Hartwig, J.H. and Stossel, T.P. (2007). Structural basis of filamin A functions. *J. Cell Biol.* **179**, 1011-1025.
- Stossel, T.P., Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J.H., Noegel, A., Schleicher, M. and Shapiro, S.S. (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, *2*, 138-145.
- Cunningham, C.C., Gorlin, J.B., Kwiatkowski, D.J., Hartwig, J.H., Janmey, P.A., Byers, H.R. and Stossel, T.P. (1992). Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science*, **255**, 325-327.
- Nagano, T., Morikubo, S. and Sato, M. (2004). Filamin A and FILIP (Filamin A-Interacting Protein) regulate cell polarity and motility in neocortical subventricular and intermediate zones during radial migration. *J. Neurosci.*, 24, 9648-9657.
- Feng, Y., Chen, M.H., Moskowitz, I.P., Mendonza, A.M., Vidali, L., Nakamura, F., Kwiatkowski, D.J. and Walsh, CA. (2006). Filamin A (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **103**, 19836-19841.
- 15. Hart, A.W., Morgan, J.E., Schneider, J., West, K., McKie, L., Bhattacharya, S.,

Carabalona et al.

Jackson, I.J. and Cross, S.H. (2006). Cardiac malformations and midline skeletal defects in mice lacking filamin A. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 2457-2467.

- Saito, T. and Nakatsuji, N. (2001). Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using *in vivo* electroporation. *Dev. Biol.*, **240**, 237-246.
- Bai, J., Ramos, R.L., Ackman, J.B., Thomas, A.M., Lee, R.V. and LoTurco, J.J. (2003). RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat. Neurosci.*, 6, 1277-1283.
- Jaglin, X.H., Poirier, K., Saillour, Y., Buhler, E., Tian, G., Bahi-Buisson, N., Fallet-Bianco, C., Phan-Dinh-Tuy, F., Kong, X.P., Bomont, P. *et al.* (2009). Mutations in Human Beta-2b Tubulin Result in Asymmetrical Polymicrogyria. *Nat. Genet.*, **41**, 746-752.
- Kakita, A., Hayashi, S., Moro, F., Guerrini, R., Ozawa, T., Ono, K., Kameyama, S., Walsh, C.A. and Takahashi, H. (2002). Bilateral periventricular nodular heterotopia due to filamin 1 gene mutation: widespread glomeruloid microvascular anomaly and dysplastic cytoarchitecture in the cerebral cortex. *Acta Neuropathol.*, **104**, 649-657.
- Thom, M., Martinian, L., Parnavelas, J.G. and Sisodiya, SM. (2004). Distribution of cortical interneurons in grey matter heterotopia in patients with epilepsy. *Epilepsia.* 45, 916-923.
- Ferland, R.J., Batiz, L.F., Neal, J., Lian, G., Bundock, E., Lu, J., Hsiao, Y.C., Diamond, R., Mei, D., Banham, A.H. *et al.* (2009). Disruption of neural progenitors along the ventricular and subventricular zones in periventricular heterotopia. *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 497-516.
- 22. Ayala, R., Shu, T. and Tsai, L.H. (2007). Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell*, **128**, 29-43.
- 23. Götz, M. and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. Nat. Rev.

Carabalona et al.

Mol. Cell Biol., 6, 777-788.

- Graus-Porta, D., Blaess, S., Senften, M., Littlewood-Evans, A., Damsky, C., Huang, Z., Orban, P., Klein, R., Schittny, J.C. and Müller, U. (2001). β1-Class Integrins Regulate the Development of Laminae and Folia in the Cerebral and Cerebellar Cortex. *Neuron*, **31**, 367-379.
- Loulier, K., Lathia, J.D., Marthiens, V., Relucio, J., Mughal, M.R., Tang, S.C., Coksaygan, T., Hall, P.E., Chigurupati, S., Patton, B., *et al.* (2009). Beta1 integrin maintains integrity of the embryonic neocortical stem cell niche. *PLoS Biology*, 7, e1000176.
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Wong, W.S., Clinton, B.K. and Kriegstein, A.R. (2002). Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J. Neurosci.*, **22**, 3161-3173.
- Anthony, T.E., Klein, C., Fishell, G. and Heintz, N. (2004). Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron*, **41**, 881-890.
- 28. Spassky, N., Merkle, F.T., Flames, N., Tramontin, A.D., Garcia-Verdugo, J.M. and Alvarez-Buylla, A. (2005). Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J. Neurosci.*, **25**, 10-18.
- Klioueva, I.A., Van Luijtelaar, E.L., Chepurnova, N.E. and Chepurnov, S.A. (2001). PTZ-induced seizures in rats: effects of age and strain. *Physiol. Behav.*, **72**, 421-426.
- 30. Santi, M.R. and Golden, J.A. (2001). Periventricular heterotopia may result from radial glial fiber disruption. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **60**, 856-862.
- 31. Schmechel, D.E. and Rakic, P. (1979). A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into

astrocytes. Anat. Embryol. (Berl). 156, 115-152.

- Miyata, T. and Ogawa, M. (2007). Twisting of neocortical progenitor cells underlies a spring-like mechanism for daughter-cell migration. *Curr. Biol.*, **17**, 146-151.
- 33. Takeichi, M. (2007). The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nat. Rev. Neurosci.*, **8**, 11-20.
- 34. Alvarez-Buylla, A. and Lim, D.A. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*, **41**, 683–686.
- Lathia, J.D., Patton, B., Eckley, D.M., Magnus, T., Mughal, M.R., Sasaki, T., Caldwell, MA., Rao, M.S., Mattson, M.P. and Ffrench-Constant, C. (2007).
 Patterns of laminins and integrins in the embryonic ventricular zone of the CNS. *J. Comp. Neurol.*, **505**, 630-643.
- Kim, H., Nakamura, F., Lee, W., Hong, C., Pérez-Sala, D. and McCulloch, CA. (2010). Regulation of cell adhesion to collagen via beta1 integrins is dependent on interactions of filamin A with vimentin and protein kinase C epsilon. *Exp. Cell Research*, **316**, 1829-1844.
- Ivaska, J., Vuoriluoto, K., Huovinen, T., Izawa, I., Inagaki, M. and Parker, PJ. (2005). PKCepsilon-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility. *EMBO J.*, **24**, 3834-3845.
- Kim, H., Nakamura, F., Lee, W., Shifrin, Y., Arora, P. and McCulloch, C.A. (2010). Filamin A is required for vimentin-mediated cell adhesion and spreading. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **298**, 221-236.
- Fortin, S., Le Mercier, M., Camby, I., Spiegl-Kreinecker, S., Beger, W., Lefranc,
 F. and Kiss, R. (2010). Galectin-1 Is Implicated in the Protein Kinase
 Cε/Vimentin-Controlled Trafficking of Integrin-β1 in Glioblastoma Cells. *Brain Pathol.*, **20**, 39-49.

- 40. Leask, A., Shi-Wen, X., Khan, K., Chen, Y., Holmes, A., Eastwood, M., Denton, C.P., Black, C.M. and Abraham, D.J. (2008). Loss of protein kinase Cepsilon results in impaired cutaneous wound closure and myofibroblast function. J. Cell Sci., **121**, 3459-3467.
- 41. Loo, D.T., Kanner, S.B. and Aruffo, A. (1998). Filamin binds to the cytoplasmic domain of the beta1-integrin Identification of amino acids responsible for this interaction. J. Biol. Chem., 273, 23304-23312.
- Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L. and Kriegstein, A.R. (2004). Cortical 42. neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. Nat. Neurosci., 7, 136-144.
- 43. Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V. and Kriegstein, A.R. (2008). Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. J. Comp. Neurol., 508, 28-44.
- 44. Lien, W.H., Klezovitch, O., Fernandez, T.E., Delrow, J. and Vasioukhin, V. (2006). AlphaE-catenin controls cerebral cortical size by regulating the hedgehog signaling pathway. Science, **311**, 1609-1612.
- 45. Woodhead, G.J., Mutch, C.A., Olson, E.C. and Chenn, A. (2006). Cellautonomous beta-catenin signaling regulates cortical precursor proliferation. J. Neurosci., 26, 12620-12630
- Katayama, K., Melendez, J., Baumann, J.M., Leslie, J.R., Chauhan, B.K., 46. Nemkul, N., Lang, R.A., Kuan, CY., Zheng, Y. and Yoshida, Y. (2011). Loss of RhoA in neural progenitor cells causes the disruption of adherens junctions and hyperproliferation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 108, 7607-7612.
- 47. Lange, M., Winner, B., Müller, J.L., Marienhagen, J., Schröder, M., Aigner, L., Uyanik, G. and Winkler, J. (2004). Functional imaging in PNH caused by a new FilaminA mutation. Neurology, 62, 151-152.

- Scherer, C., Schuele, S., Minotti, L., Chabardes, S., Hoffmann, D. and Kahane,
 P. (2005). Intrinsic epileptogenicity of an isolated periventricular nodular heterotopia. *Neurology*, **65**, 495-496.
- Tassi, L., Colombo, N., Cossu, M., Mai, R., Francione, S., Lo Russo, G., Galli, C., Bramerio, M., Battaglia, G., Garbelli, R. *et al.* (2005). Electroclinical., MRI and neuropathological study of 10 patients with nodular heterotopia., with surgical outcomes. *Brain*, **128**, 321-337.
- Solé, G., Coupry, I., Rooryck, C., Guérineau, E., Martins, F., Devés, S., Hubert, C., Souakri, N., Boute, O., Marchal, C. *et al.* (2009). Bilateral periventricular nodular heterotopia in France: frequency of mutations in FLNA., phenotypic heterogeneity and spectrum of mutations. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **80**, 1394-1398.

 Carabalona et al.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. FlnA protein expression in developing rat cerebral cortex. (**A**) Western blot analysis of rat FlnA protein levels during brain development at the indicated time points (top). FlnA was expressed during embryonic stages but markedly reduced after P11. Brain homogenates were immunoblotted for Actin as a loading control (bottom). (**B**-**F**) Immunohistochemistry revealed strong labeling of FlnA in the VZ/IZ of E14 brain coronal section (B), restricted to the VZ at E20 (D) and persisted in the periventricular zone until P7 (F). Panels (C,E and G) are higher magnification images of areas outlined in panels (B,D and F). Scale bars: 500 μm (F); 200μm (D); 100 μm (B,C,E and G).

Figure 2. *In utero* knockdown of FInA expression by RNAi alters neuronal migration in embryonic rat neocortex. (**A**) Schematic diagram showing the position of smallhairpin RNAs targeting the coding sequence (CDShp) and the 3'-untranslated region (3UTRhp) of FInA mRNA. (**B**) Knockdown of endogenous FInA mRNA expression in rat C6 glioma cells was measured by qPCR 48 hours after transfection with CDShp or 3UTRhp. We observed a reduction of FInA mRNA expression ranging from 60– 70% compared to corresponding ineffective shRNAs (CDSm3hp and 3UTRm3hp). Cyclophilin A was used for normalization. (**C**) Western-blot analysis revealed that FInA protein levels, 48 hours after transfected with CDSm3hp or 3UTRm3hp. α tubulin was used for normalization. (**D** and **F**) Representative neocortical coronal sections showing migration of transfected cells 2 days (D) and 5 days (F) after electroporation at E15 with either RFP construct alone (control) or combined with 3UTRhp or 3UTRm3hp. (**E** and **G**) Quantification (means ± SEM) of RFP-positive cell

distribution in 8 arbitrary strata dividing the cortex. RFP-positive cells were counted in strata 1 and 2 corresponding to the ventricular zone (VZ), in strata 3, 4 and 5 to the intermediate zone (IZ) and strata 6, 7 and 8 to the cortical plate (CP) and expressed as a percentage of the total. Quantification of independent brains was carried out after 2 days (E) (RFP n=11; 3UTRhp n=9; 3UTRm3hp n=8) or 5 days (G) (RFP n=10; 3UTRhp n=12; 3UTRm3hp n=9) after transfection at E15. ***P<0.001 as compared to control and 3UTRm3hp (E and G). Scale bars 200 μ m.

Figure 3. Expression of full-length FInA rescues the radial migration defect of FInAknockdown cortical neurons. (**A** and **B**) Representative coronal sections of E20 rat brains 5 days after electroporation with either pCAGIG empty vector (or Control) (A) or with FInA-IRES-GFP construct (**B**). (**C**) Quantification (means \pm SEM) of GFPpositive cells distribution in the ventricular zone (VZ = strata 1,2), the intermediate zone (IZ = strata 3-5) and the cortical plate (CP = strata 6-8) of independent brains at E20 (Control n=10; FInA-IRES-GFP n=9) and expressed as a percentage of the total. Five days after electroporation, the majority of GFP-positive cells have reached the cortical plate of control (84.1 \pm 3.4%) and FInA-IRES-GFP transfected brains (83.3 \pm 4.05%). (**D** and **E**) Rescue experiment was performed using 3UTRhp combined with an empty GFP construct (D), or combined with FInA-IRES-GFP (E). (**F**) Quantification (means \pm SEM) of GFP-positive cell distribution in the cortices of E20 independent brains, electroporated 5 days earlier with either 3UTRhp (n=12) or FInA-IRES-GFP combined with 3UTRhp (n=6). **P<0.01 as compared to 3UTRhp.

Figure 4. Knockdown of FInA leads to the formation of PH in P7 rat pup brains. (**A** and **B**) Representative neocortical sections showing the laminar position of transfected cells in rats electroporated at E15 with either RFP construct alone (or

Carabalona et al.

control) (A) or combined with 3UTRhp (B) and analyzed postnatally at P7. In control brain, RFP-positive cells are mainly found in layers II/III/IV of neocortex (A). In contrast, in 3UTRhp brains, several transfected cells formed an ectopic mass near the ventricular surface (arrowheads). Numerous transfected cells (arrows) extend out of the heterotopia into all neocortical layers (B). (C) Evaluation of nodule size (in mm²) in FInA knockdown brains (n= 13). The average nodule size (marked by a horizontal line) was estimated at around 0.25 mm². (D-F) Immunostaining of 3UTRhp brain sections at P7 revealed the presence of both transfected and non-transfected cells that were immunopositive for the neuronal marker NeuN (D), cortical upper layers marker CDP (E) and the deeper layers marker FoxP2 (F). High magnification views of the boxed sections in merged images show both transfected and nontransfected neurons. (G and H) Heterotopia also contained several interneurons labelled with GABA marker (G) and many differentiated astrocytes positive for S100ß (H). (I) Numbers of transfected and non-transfected NeuN+, CDP+, FoxP2+ neurons GABA+ interneurons and S100β+ astrocytes in a surface aera of 0.25 mm² which represents the average nodule size (defined in C). Scale bars: 500µm (A,B,D,E and F); 100µm (G,H and high magnification insets in D,E and F).

Figure 5. Genesis of PH mediated by FInA knockdown is linked to radial glia disruption. (**A**-**H**) Representative coronal sections of E17 (A-D) or E20 (E-H) rat brains transfected at E15 with either RFP alone (control) or combined with 3UTRhp and immunostained for vimentin (in green). In 3UTRhp brain sections at E17 (B,C and D) and E20 (F,G and H) compared to age-matched controls (A and E), vimentin staining revealed a marked disruption of radial glial apical fibers. Panels (C,D,G and H) display higher-magnifications of regions indicated by an arrow in (B and F). (I and J) Apical processes of transfected radial glial cells with the BLBP-GFP construct

alone (I) or combined with 3UTRhp (J). Arrowheads point to the apical processes. (**K**) Quantification (means \pm SEM) of radial glial apical process orientation in the ventricular zone of the 3UTRhp independent brains (n= 10) compared to BLBP-GFP (n= 10). (**L-S**) Representative coronal sections of E17 and E20 rat cortices transfected with RFP alone (control) or combined with 3UTRhp and immunostained for β 1-integrin (L,N,P and R) or β -catenin (M,O,Q and S) markers. In the VZ of 3UTRhp brains, β 1-integrin (N and R) and β -catenin (O and S) staining was discontinuous along the neuroepithelial lining (arrowheads) in regions where RFP-positive cells accumulate. ***P<0.001 as compared to BLBP-GFP (K). Scale bars: 200 µm (A,B,E and F); 100µm (C,D,G and H); 50 µm (I,J,L-S).

Figure 6. FInA is required for cell cycle progression of cortical progenitors. (**A-C** and **E-G**) Confocal images of the ventricular zone (VZ) of rat cortices transfected at E15 with RFP alone or combined with 3UTRhp or with 3UTRm3hp and immunostained 40-42 hours later with the proliferation marker Ki67 (in green) (A, B and C) or with the M-phase marker phosphovimentin (4A4, in green) (E,F and G). Transfected cells positive for either marker appeared in yellow (arrows). (**D** and **H**) Quantification (means ± SEM) of RFP and Ki67 (D) or RFP and 4A4 (H) double-positive transfected cells in the VZ of independent brains (for Ki67: RFP n= 7; 3UTRhp n= 5; 3UTRm3hp n= 5 and for 4A4: RFP n= 6; 3UTRhp n= 9; 3UTRm3hp n= 6). The percentage of total transfected cells that were positive for Ki67 or 4A4 was reduced significantly in FlnA knockdown brains compared to control or 3UTR3mhp. *P<0.05, **P<0.01 as compared to control and 3UTRm3hp (D and H). Scale bars: 50 µm.

Figure 7. Alterations of the radial glia scaffold in a human PH brain harboring a novel frameshift mutation in the C-terminal region of FLNA. (**A**) Macroscopic appearance of
Human Molecular Genetics

Carabalona et al.

nodular heterotopias in a post-mortem brain of a 3 month-old female. Note the small protrusions into the ventricle from the lateral wall (arrows). (B) Hematoxylin and eosin stainings show the lateral ventricle with contiguous nodules (arrows) along its lateral border. (C) Schematic representation of the FLNA protein showing the position of the heterozygous frameshift mutation identified in our patient. (D-G) Photomicrographs of brain sections from a 3 months-old control (D and E) and our PH patient (F and G), immunostained for vimentin, showed alteration in neuroependyma at areas immediately below the nodules. In areas around PH, vimentin staining revealed radial glial-like immunoreactivity (arrowhead) (F). High magnifications (E and G) of areas outlined in panels (D and F) displayed disruption of the neuroependymal lining and loss of ependymal cells along PH. (H-K) Photomicrographs of β1-integrin staining along the ventricular wall in control (H and I) and PH (J and K) brains, demonstrated disruption in cell-cell junctions and in neuroepithelial lining below heterotopia. Areas outlined in panels (H and J) point to ependymal cells shown at higher magnification in (I and K) respectively. Note that the few remaining ependymal cells below PH were strongly stained by β 1-integrin (arrowhead in K). In comparison, in control brain, β 1integrin labelling was mainly restricted to the basal membrane of vessels (arrow in I). Scale bars: 500µm (D and F); 100µm (H and J); 50µm (E,G,I and K).

Figure 8. Increased susceptibility to Pentylenetetrazol (PTZ) induced seizures in FInA knockdown rats at P30. (**A** and **B**) Quantification of doses of PTZ (A) and mean latency (B) to induce generalized tonico-clonic seizures in two groups of rats electroporated at E15 : control or malformation free rats (n=9) and FInA-knockdown rats (3UTRhp, n=11) displaying periventricular heterotopia. (**C**) Survival rate of control and FInA-knockdown (or 3UTRhp) rats after generalized seizures. ***P<0.001 as compared to control.



Carabalona et al. Figure 1

FInA protein expression in developing rat cerebral cortex. (A) Western blot analysis of rat FInA protein levels during brain development at the indicated time points (top). FInA was expressed during embryonic stages but markedly reduced after P11. Brain homogenates were immunoblotted for Actin as a loading control (bottom). (B-F) Immunohistochemistry revealed strong labeling of FInA in the VZ/IZ of E14 brain coronal section (B), restricted to the VZ at E20 (D) and persisted in the periventricular zone until P7 (F). Panels (C,E and G) are higher magnification images of areas outlined in panels (B,D and F). Scale bars: 500 μm (F); 200μm (D); 100 μm (B,C,E and G). 180x199mm (300 x 300 DPI)



In utero knockdown of FInA expression by RNAi alters neuronal migration in embryonic rat neocortex. (A) Schematic diagram showing the position of small-hairpin RNAs targeting the coding sequence (CDShp) and the 3'-untranslated region (3UTRhp) of FInA mRNA. (B) Knockdown of endogenous FInA mRNA expression in rat C6 glioma cells was measured by gPCR 48 hours after transfection with CDShp or 3UTRhp. We observed a reduction of FInA mRNA expression ranging from 60–70% compared to corresponding ineffective shRNAs (CDSm3hp and 3UTRm3hp). Cyclophilin A was used for normalization. (C) Western-blot analysis revealed that FInA protein levels, 48 hours after transfection, were much lower in cells transfected with CDShp or 3UTRhp than those transfected with CDSm3hp or 3UTRm3hp. a-tubulin was used for normalization. (D and F) Representative neocortical coronal sections showing migration of transfected cells 2 days (D) and 5 days (F) after electroporation at E15 with either RFP construct alone (control) or combined with 3UTRhp or 3UTRm3hp. (E and G) Quantification (means ± SEM) of RFP-positive cell distribution in 8 arbitrary strata dividing the cortex. RFP-positive cells were counted in strata 1 and 2 corresponding to the ventricular zone (VZ), in strata 3, 4 and 5 to the intermediate zone (IZ) and strata 6, 7 and 8 to the cortical plate (CP) and expressed as a percentage of the total. Quantification of independent brains was carried out after 2 days (E) (RFP n=11; 3UTRhp n=9; 3UTRm3hp n=8) or 5 days (G) (RFP n=10; 3UTRhp n=12; 3UTRm3hp n=9) after transfection at E15. ***P<0.001 as compared to

control and 3UTRm3hp (E and G). Scale bars 200 $\mu m.$ 180x199mm (300 x 300 DPI)

Human Molecular Genetics



54





Expression of full-length FInA rescues the radial migration defect of FInA-knockdown cortical neurons. (A and B) Representative coronal sections of E20 rat brains 5 days after electroporation with either pCAGIG empty vector (or Control) (A) or with FInA-IRES-GFP construct (B). (C) Quantification (means ± SEM) of GFP-positive cells distribution in the ventricular zone (VZ = strata 1,2), the intermediate zone (IZ = strata 3-5) and the cortical plate (CP = strata 6-8) of independent brains at E20 (Control n=10; FInA-IRES-GFP n=9) and expressed as a percentage of the total. Five days after electroporation, the majority of GFP-positive cells have reached the cortical plate of control (84.1 ± 3.4%) and FInA-IRES-GFP transfected brains (83.3 ± 4.05%). (D and E) Rescue experiment was performed using 3UTRhp combined with an empty GFP construct (D), or combined with FInA-IRES-GFP (E). (F) Quantification (means ± SEM) of GFP-positive cell distribution in the cortices of E20 independent brains, electroporated 5 days earlier with either 3UTRhp (n=12) or FInA-IRES-GFP combined with 3UTRhp (n=6). **P<0.01 as compared to 3UTRhp. 180x199mm (300 x 300 DPI)





Knockdown of FInA leads to the formation of PH in P7 rat pup brains. (A and B) Representative neocortical sections showing the laminar position of transfected cells in rats electroporated at E15 with either RFP construct alone (or control) (A) or combined with 3UTRhp (B) and analyzed postnatally at P7. In control brain, RFP-positive cells are mainly found in layers II/III/IV of neocortex (A). In contrast, in 3UTRhp brains, several transfected cells formed an ectopic mass near the ventricular surface (arrowheads). Numerous transfected cells (arrows) extend out of the heterotopia into all neocortical layers (B). (C) Evaluation of nodule size (in mm2) in FInA knockdown brains (n= 13). The average nodule size (marked by a horizontal line) was estimated at around 0.25 mm2. (D-F) Immunostaining of 3UTRhp brain sections at P7 revealed the presence of both transfected and non-transfected cells that were immunopositive for the neuronal marker NeuN (D), cortical upper layers marker CDP (E) and the deeper layers marker FoxP2 (F). High magnification views of the boxed sections in merged images show both transfected and non-transfected neurons. (G and H) Heterotopia also contained several interneurons labelled with GABA marker (G) and many differentiated astrocytes positive for S100β (H). (I) Numbers of transfected and non-transfected NeuN+, CDP+, FoxP2+ neurons GABA+ interneurons and S100 β + astrocytes in a surface aera of 0.25 mm2 which represents the average nodule size (defined in C). Scale bars: 500µm (A,B,D,E and F); 100µm (G,H and high magnification insets in D,E and F).

180x199mm (300 x 300 DPI)



Genesis of PH mediated by FInA knockdown is linked to radial glia disruption. (A-H) Representative coronal sections of E17 (A-D) or E20 (E-H) rat brains transfected at E15 with either RFP alone (control) or combined with 3UTRhp and immunostained for vimentin (in green). In 3UTRhp brain sections at E17 (B,C and D) and E20 (F,G and H) compared to age-matched controls (A and E), vimentin staining revealed a marked disruption of radial glial apical fibers. Panels (C,D,G and H) display higher-magnifications of regions indicated by an arrow in (B and F). (I and J) Apical processes of transfected radial glial cells with the BLBP-GFP construct alone (I) or combined with 3UTRhp (J). Arrowheads point to the apical processes. (K) Quantification (means ± SEM) of radial glial apical process orientation in the ventricular zone of the 3UTRhp independent brains (n= 10) compared to BLBP-GFP (n= 10). (L-S) Representative coronal sections of E17 and E20 rat cortices transfected with RFP alone (control) or combined with 3UTRhp and immunostained for β1-integrin (L,N,P and R) or β-catenin (M,O,Q and S) markers. In the VZ of 3UTRhp brains, β1-integrin (N and R) and β-catenin (O and S) staining was discontinuous along the neuroepithelial lining (arrowheads) in regions where RFP-positive cells accumulate. ***P<0.001 as compared to BLBP-GFP (K). Scale bars: 200 μm (A,B,E and F); 100μm (C,D,G and H); 50 μm (I,J,L-S).

180x199mm (300 x 300 DPI)

- 6







FlnA is required for cell cycle progression of cortical progenitors. (A-C and E-G) Confocal images of the ventricular zone (VZ) of rat cortices transfected at E15 with RFP alone or combined with 3UTRhp or with 3UTRm3hp and immunostained 40-42 hours later with the proliferation marker Ki67 (in green) (A, B and C) or with the M-phase marker phosphovimentin (4A4, in green) (E,F and G). Transfected cells positive for either marker appeared in yellow (arrows). (D and H) Quantification (means ± SEM) of RFP and Ki67 (D) or RFP and 4A4 (H) double-positive transfected cells in the VZ of independent brains (for Ki67: RFP n= 7; 3UTRhp n= 5; 3UTRm3hp n= 5 and for 4A4: RFP n= 6; 3UTRhp n= 9; 3UTRm3hp n= 6). The percentage of total transfected cells that were positive for Ki67 or 4A4 was reduced significantly in FlnA knockdown brains compared to conrol or 3UTR3mhp.
*P<0.05, **P<0.01 as compared to control and 3UTRm3hp (D and H). Scale bars: 50 µm. 180x199mm (300 x 300 DPI)

Carabalona et al. Figure 7



Alterations of the radial glia scaffold in a human PH brain harboring a novel frameshift mutation in the C-terminal region of FLNA. (A) Macroscopic appearance of nodular heterotopias in a postmortem brain of a 3 month-old female. Note the small protrusions into the ventricle from the lateral wall (arrows). (B) Hematoxylin and eosin stainings show the lateral ventricle with contiguous nodules (arrows) along its lateral border. (C) Schematic representation of the FLNA protein showing the position of the heterozygous frameshift mutation identified in our patient. (D-G) Photomicrographs of brain sections from a 3 months-old control (D and E) and our PH patient (F and G), immunostained for vimentin, showed alteration in neuroependyma at areas immediately below the nodules. In areas around PH, vimentin staining revealed radial glial-like immunoreactivity (arrowhead) (F). High magnifications (E and G) of areas outlined in panels (D and F) displayed disruption of the neuroependymal lining and loss of ependymal cells along PH. (H-K) Photomicrographs of β 1-integrin staining along the ventricular wall in control (H and I) and PH (J and K) brains, demonstrated disruption in cell-cell junctions and in neuroepithelial lining below heterotopia. Areas outlined in panels (H and J) point to ependymal cells shown at higher magnification in (I and K) respectively. Note that the few remaining ependymal cells below PH were strongly stained by \u03b31-integrin (arrowhead in K). In comparison, in control brain, \u03b31-integrin labelling was mainly restricted to the basal membrane of vessels (arrow in I). Scale bars: 500µm (D

and F); 100µm (H and J); 50µm (E,G,I and K). 180x199mm (300 x 300 DPI)





Increased susceptibility to Pentylenetetrazol (PTZ) induced seizures in FlnA knockdown rats at P30. (A and B) Quantification of doses of PTZ (A) and mean latency (B) to induce generalized tonicoclonic seizures in two groups of rats electroporated at E15 : control or malformation free rats (n=9) and FlnA-knockdown rats (3UTRhp, n=11) displaying periventricular heterotopia. (C) Survival rate of control and FlnA-knockdown (or 3UTRhp) rats after generalized seizures. ***P<0.001 as compared to control. 180x199mm (300 x 300 DPI)

<u>Résumé :</u>

Des mutations du gène ARX (<u>a</u>ristaless-<u>r</u>elated homeobo<u>x</u> gene) ont été identifiées dans un large spectre de désordres neurologiques précoces, incluant ou non des malformations cérébrales, le plus souvent associés à des épilepsies. Il est proposé que le gène ARX, codant pour un facteur de transcription, joue un rôle primordial au cours du développement cérébral, notamment sur la migration des neurones GABAergiques, mais son implication au cours de la mise en place du système nerveux central reste cependant encore mal connue. L'objectif de ce travail a été d'étudier le rôle du gène ARX et les conséquences de ses mutations sur le développement cérébral dans le but de mieux comprendre ces pathologies.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet d'une mutation particulière du gène, la mutation ARX(CGC)7, une expansion polyalanine retrouvée principalement dans des pathologies sans malformation cérébrale mais avec des épilepsies, tels que les syndromes de West ou d'Ohtahara. Des analyses réalisées sur une lignée de souris knock-in pour cette mutation (GCG)7 et sur des rats après électroporation *in utero* ont montré que la migration neuronale des neurones glutamatergiques et GABAergiques ainsi que la maturation des neurones GABAergiques ne sont pas altérées par cette mutation. De façon intéressante, nos données suggèrent que les épilepsies observées chez les souris knock-in résulteraient plutôt d'une réorganisation du réseau glutamatergique. Etant donné que le gène ARX n'est pas exprimé dans les neurones glutamatergiques, l'ensemble de ce travail suggère donc que les épilepsies chez les souris knock-in pour la mutation (GCG)7 sont la conséquence d'une altération développementale secondaire à la mutation initiale du gène, et ceci aurait d'importantes répercussions thérapeutiques qui requièrent d'avantages d'études.

Des expériences nous ont ensuite permis d'étudier l'effet de plusieurs mutations du gène ARX sur la morphologie des interneurones *in vitro*. Celles-ci ont montré que les mutations d'ARX n'engendrent pas une localisation subcellulaire anormale de la protéine dans les interneurones en culture. De façon intéressante, ces expériences suggèrent que la morphologie des interneurones est altérée seulement par certaines mutations, notamment les mutations P353R et Dup24. Ces données soulignent ainsi l'importance d'étudier de façon spécifique chaque mutation du gène pour expliquer les mécanismes engendrant l'hétérogénéité phénotypique liée aux mutations d'ARX.

L'ensemble de ces travaux contribuent à une meilleure compréhension du rôle du gène ARX dans le développement cortical et à une meilleure caractérisation des mécanismes physiopathologiques des désordres neurologiques précoces liés aux mutations de ce gène.

Title: Pathophysiological consequences of ARX mutations on cerebral development.

<u>Abstract :</u>

Several mutations in ARX gene (<u>a</u>ristaless-<u>r</u>elated homeobox gene) have been found in a large spectrum of infantile neurological disorders, with or without cerebral malformation, but frequently linked to epilepsy. It has been proposed that ARX, coding for a transcription factor, plays a crucial role in brain development, especially in migrating interneurons, but its involvement in nervous system development still remains to be clarified.

The aim of this work has been to study the role of ARX gene and the consequences of ARX mutations on cerebral development in order to better understand these pathologies.

We have first investigated the effects of an ARX polyalanine expansion, the mutation (GCG)7, which was found in pathologies without brain malformation but associated to epilepsy, such as West and Ohtahara syndromes. Analysis performed on knock-in mice for this mutation and *in utero* electroporated rat brains have shown that this mutation doesn't alter neither glutamatergic and GABAergic neuronal migration, nor GABAergic neuron maturation. Interestingly, our data suggest that epilepsy observed in knock-in mice would result rather from a reorganization of glutamatergic networks. Since ARX gene is not expressed in excitatory neurons, our work suggests that epilepsy observed in knock-in mice is the consequence of developmental alterations secondary to the initial mutation, and this would have crucial therapeutic implications that require additional investigations.

In vitro experiments have then allowed us to study the effect of several ARX mutations on interneurons morphology. These experiments have shown no abnormal subcellular localization of ARX protein following transfection of these different mutations in cultured interneurons. Interestingly, our data show that interneuron morphology is altered only by some mutations, particularly the P353R and the Dup24 ARX mutations. Our data underline the importance to study specifically each mutation in order to explain mechanisms generating phenotypic heterogeneity linked to ARX mutations.

Taken together, this study contributes to a better understanding of ARX involvement in cerebral development and to a better characterization of pathophysiological mechanisms linked to ARX mutations.

Discipline : Neurosciences.

Mots-clés : ARX, migration neuronale, développement cortical, désordres neurologiques précoces. Laboratoire : Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INMED) / INSERM U901, 163 Route de Luminy BP 13, 13273 Marseille cedex 09.