amU
Aix Marseille Université

NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 13 Décembre 2024 par

Léa CORBIÈRES

Étude des mécanismes physiopathologiques des hétérotopies nodulaires périventriculaires associées aux mutations des gènes *FAT1* et *FLNA*

Discipline
Biologie Santé

Spécialité
Neurosciences

École doctorale
ED62 – SCIENCE DE LA VIE ET DE LA SANTÉ)

Laboratoire
Institut de Neurobiologie de la Méditerrannée (INMED) INSERM U1249

Composition du jury

Alexandre BAFFET CR, Institut Curie Paris	Rapporteur
Alessandra PIERANI DR, Institut Imagine Paris	Rapporteuse
Sara BIZZOTTO CR, Institut du cerveau Paris	Examinatrice
Christophe PORCHER PR, INMED Marseille	Président du jury
Carlos CARDOSO DR, INMED Marseille	Directeur de thèse
Françoise HELMBACHER DR, IBDM Marseille	Membre invitée

Inmed
Institut de neurobiologie de la méditerranée

Inserm

Affidavit

Je soussigné, Léa Corbières, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Carlos Cardoso, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.
Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 4 octobre 2024



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste de publications et participation aux conférences

1) Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

   1. **Falace A***, **Corbieres L***, Palminha C, Guarnieri FC, Schaller F, Buhler E, Tuccari di San Carlo C, Montheil A, Watrin F, Manent JB, Represa A, de Chevigny A, Pallesi-Pocachard E, Cardoso C. FLNA regulates neuronal maturation by modulating RAC1-Cofilin activity in the developing cortex. Neurobiol Dis. 2024 Aug;198:106558. doi: 10.1016/j.nbd.2024.106558. Epub 2024 Jun 7. PMID: 38852754.
   2. **Corbières L**, Silvagnoli L., Ginaux V., Buhler E., Pallesi-Pocachard E., Helmbacher F., Cardoso C. Atypical cadherin Fat1 regulates radial migration and morphology of newborn neurons in the developing cortex. In prep.
   3. **Mathieu R**, Corbières L, Draia-Nicolau T, Govindan A, Bensa V, Pallesi-Pocachard E, Represa A, Cardoso C., Telley L., et de Chevigny A. Inferring Ligand-Receptor Interactions between GABAergic and Glutamatergic neurons during somatosensory cortex development. *bioRxiv*, 1 janvier 2024, 2024.09.02.610245. https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245.

2) Participation aux conférences et écoles d'été au cours de la période de thèse :

   Présentation posters :

   1. **FENS Forum 2022** – Présentation Poster : **Corbières L**, Falace A, Palminha C, Guarnieri F, Schaller F, Cvekovik M, Represa A, De Chevigny A, Pallesi-Pochard E, Cardoso C. et al., FLNA regulates cell-autonomous neuronal maturation. Juillet 2022, Paris

   2. **NeuroFrance 2023** – Présentation Poster: **Corbières L**, Giniaux V, Helmbacher F, Cardoso C. Role of the protocadherin Fat1 in cortical development and related disorders. Juin 2023, Lyon

   3. **Society for Neuroscience 2023** – Présentation Poster: **Corbières L**, Giniaux V, Helmbacher F, Cardoso C. Role of the protocadherin Fat1 in cortical development and related disorders. Novembre 2023, Washington D.C.

RÉSUMÉ

Les hétérotopies nodulaires périventriculaire (PVNH) sont des malformations corticales caractérisées par la présence de neurones ectopiques bordant les ventricules. Sur le plan clinque, les PVNH sont associées à de l'épilepsie, des troubles du spectre autistique et des déficits cognitifs. Les crises d'épilepsie proviennent principalement du cortex normotopique adjacent ou de l'association avec l'hétérotopie, suggérant que la perturbation des circuits corticaux pourrait favoriser leur apparition. Au cours de ma thèse, j'ai démontré que *Flna*, un gène impliqué dans l'étiologie des PVNH, régule la spinogenèse et dendritogenèse via la voie de signalisation Rac1-Cofiline. Bien que de nombreux gènes causatifs des PVNH aient été identifiés, l'origine génétique de 70% des cas sporadique reste inconnue. Ainsi, grâce au séquençage de l'exome entier d'un cas clinique de PVNH bilatérales, nous avons identifié des mutations faux sens hétérozygotes composites sur le gène codant la cadhérine atypique *FAT1*. Mon travail de thèse a révélé le rôle de Fat1 dans la migration neuronale, la dendritogenèse et l'établissement des couches corticales. En résumé, mes travaux soulignent les rôles cruciaux de Fat1 et Flna dans l'organisation laminaire du cortex et la maturation neuronale, contribuant à une nouvelle compréhension des mécanismes physiopathologiques associées aux PVNH.

Mots-clés : Développement cortical, Migration neuronale, Maturation, PVNH, Électroporation in utero

ABSTRACT

Periventricular nodular heterotopia (PVNH) is a cortical malformation characterized by ectopic neurons lining the ventricles. Clinically, PVNH is associated with epilepsy, autism spectrum disorders, and cognitive deficits. Epileptic seizures primarily originate from the adjacent normotopic cortex or in association with the heterotopia, suggesting that disruptions in cortical circuits could promote their onset. During my thesis, I demonstrated that Flna, a gene involved in the etiology of PVNH, regulates spinogenesis and dendritogenesis via the Rac1-Cofilin signaling pathway. Although many causative genes for PVNH have been identified, the genetic origin of 70% of sporadic cases remains unknown. Thus, through whole-exome sequencing of a clinical case of bilateral PVNH, we identified compound heterozygous missense mutations in the gene encoding the atypical cadherin *FAT1*. My thesis revealed a new role of Fat1 in neuronal migration, dendritogenesis, and the establishment of cortical layers. In summary, my research highlights the crucial roles of Fat1 and Flna in cortical layer organization and neuronal maturation, contributing to a new understanding of the pathophysiological mechanisms associated with PVNH.

Keywords : Cortical development, Neuronal migration, Maturation, PVNH, In utero electroporation

REMERCIMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes rapporteurs, le Dr Alexandre Baffet et la Pr Alessandra Pierani, ainsi que mon examinatrice Dr Sara Bizzotto, et le président du jury Pr Christophe Porcher, pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Je souhaite remercier mon directeur de thèse, le Dr Carlos Cardoso. Merci de m'avoir accueillie en stage, mais surtout d'avoir cru en moi pour poursuivre cette belle aventure qu'est la thèse. Je te remercie pour ces quatre années très enrichissantes, tant sur le plan scientifique que personnel. Merci de m'avoir fait confiance dans ce travail, pour ton enthousiasme ainsi que pour tes conseils avisés (et aussi pour toute tes recommandations et bonnes adresses qui ont accompagné mes divers voyages).

Je souhaite également remercier ma collaboratrice, la Dr Françoise Helmbacher. Merci d'avoir accepté de faire partie de ce projet, ce qui nous a permis d'aller plus loin. Au-delà de la collaboration scientifique, j'ai eu la chance de bénéficier de tes conseils avisés et de ton expérience sur mes projets futurs. Ces discussions m'ont été d'une grande aide et ton soutient constant à rendu cette collaboration particulièrement enrichissante.

I want to thank Dr. Antonio Falace for our collaboration. It was a pleasure working together, and I appreciate your kindness towards me, all our discussions, and your support.

Je souhaite également remercier l'intégralité de mon équipe pour tous les échanges scientifiques mais également tous les moments partagés. Merci Alfonso, Pierre, Antoine, pour vos précieux retours scientifiques. Merci Françoise pour ton écoute, ta gentillesse, tes conseils et pour toute nos discussions enrichissantes. Merci JB, pour tous tes retours mais également pour ta bonne humeur et tes blagues. Ma team de Bureau : Emmanuelle, Nagham et Lucas, merci d'avoir rendu ces journées au laboratoire plus douce (et surtout très drôle), ainsi que pour votre aide précieuse, travailler avec vous a toujours été un plaisir. Un grand merci aux anciens thésards : JC pour nos longues conversations sur la vie ; Rémi pour ta gentillesse et ton aide (même en étant sur un autre fuseau horaire) ; Louison, pour notre entraide pour les manips et pour toutes tes recommandations cinématographiques ; Karen, merci de m'avoir tout appris dans ce labo et de m'avoir formée pour les électroporations, je te dois énormément, merci aussi pour toutes nos discussions. Merci Aurélien, on a commencé ensemble dans cette équipe, un super collègue mais un ami à présent. Merci à mes stagiaires, Alexis, Ava, et surtout la plus

résistante de toute Victoria qui est venu faire 3 stages, travailler avec toi a été un plaisir. Merci à tous pour ces quatre années, vous allez me manquer.

J'aimerais également remercier l'INMED pour les quatre belles années passées dans le cadre magnifique des Calanques de Marseille, on ne peut rêver mieux. Merci à toutes les plateformes indispensables au bon fonctionnement de ce laboratoire, à toutes l'équipe de l'animalerie, Séverine, Elodie, Victor... d'avoir toujours assuré et sans qui ce travail ne serait pas possible, mais également l'administration, merci Gwendoline et Christine pour toute votre aide. Le trio de la plateforme PBMC : Émilie, Aurélie et Francesca merci pour tout, pour votre soutient et nos rires ensemble (maintenant je vais arrêter de vous embêter). Merci à François de la plateforme Imagerie pour ta patience et d'avoir volé à mon secours à chaque fois que j'ai eu besoin d'aide. Un grand merci à Aurélie et Céline pour leur aide précieuse dans l'écriture de ce manuscrit. Merci à Fabienne pour toute ton aide, merci Igor pour ta grande gentillesse. Je ne peux citer tout le monde mais merci à tous ceux qui ont toujours été là, accueillants et gentils.

Merci à tous les copains du labo, durant ces quatre ans j'ai rencontrée des personnes formidables. Merci Alex (& Amandine) pour les super soirées à Collo ; merci Mira d'avoir pris le temps de m'aider ; Alla, thank for everything, I'm really happy to have met you and you'll always be the strongest person that I've ever met, I stand with you ; Merci Cécé, Vinca, Carla, Thomas, Salomé, Félix, Sarah, Alba, Mélanie, Maud, Masha, Cloé... la liste est longue et je ne peux pas tous les citer, je remercie tous les doctorants de l'INMED pour toutes ces énormes barres de rire, ces pauses qui ont toujours aidé et les petites bières de la fin de journée ont toujours fait énormément plaisir.

Kenza, notre amitié a débuté en Master et on s'est lancées en même temps dans la même aventure qu'est la thèse (quelle idée ?). C'est une chance inouïe que d'avoir une amie à ses côtés pendant la thèse, notamment quand on veut développer ces compétences culinaires en se faisant nos tup un jour sur deux. Nos pauses café-clopes, notre intuition aiguisée, notre fine connaissance de la psychologie, et nos discussions du quotidien vont beaucoup me manquer.

Je tiens à remercier les copains du Master : Romi, Bastien, Cem, Antho, Marylin, Chloé pour avoir survécu au master ensemble et dans l'entraide, mais également pour les barres de rire, les (très nombreux) apéros et pour ne pas se perdre de vue malgré la distance. Je tiens également à remercier les copains de Licence : Sarah, Quentin et Agathe. Nous avons

tous fait des parcours de dingue et nos moments mémorables à Grenoble sont ancrés à jamais.

Enfin je remercie tous les copains de Savoie, en premier lieu les gourdes : Mel, Bbk, Lulu et Lice, merci pour cette belle amitié, d'avoir toujours été là (même si nous aimons bien nous éparpiller autour du globe), de m'avoir toujours écoutée et soutenue, je vous aime fort. BB Mana, maintenant 22 ans qu'on se connaît et rien n'a changé, merci pour tout. A Tristan, sur qui je peux toujours compter. Merci à Bonin et Élodie, même si je ne suis pas douée avec les messages, je pense fort à vous. Et toute la sacrée team : Harold & Lena pour votre présence et votre bonne humeur constante sous le soleil de Marseille, mon petit Franky, Jéjé, Benjam, Arn, Chachou grande, Chachou petite, Brouin, Coco, Ophé, Murie, Coco, Alex, Thib, Tété, Doui, Angélique & Rico (et bb Hayden). Je tiens fort à vous tous et j'ai hâte qu'on se retrouve pour arroser l'évènement ! Vous êtes des piliers, de Bar peut-être, et je suis heureuse de tous vous avoir dans ma vie.

Je tiens à remercier toute ma belle-famille pour leur soutien et leurs encouragements pendant l'écriture de cette thèse.

Je tiens à remercier toute ma famille. Merci à mes parents de m'avoir toujours soutenue, et ce depuis le début de mes études. Je vous remercie pour tout : votre soutien, votre écoute et votre amour. Cette thèse est également la vôtre. Ma petite sœur et Lucas, le petit monstre, je pense toujours à toi, je suis fière de voir ce que tu deviens. Je tiens à remercier ma Tatie Béa, merci pour ta présence, ton écoute et pour tout ce que tu représentes pour moi. Je remercie aussi mon cousin Théo qui s'accomplit aussi dans sa vie et que je suis fière de voir grandir. Je souhaite remercier ma grand-mère d'avoir toujours été là pour moi et pour son soutien. Je vous aime tous fort et j'ai hâte de vous retrouver pour rattraper le temps.

Enfin, Ugo, les mots ne suffiront certainement pas à décrire ce que je ressens. Merci d'avoir été d'un soutien sans faille, une personne sur qui je peux toujours compter, mais aussi ton aide pendant la rédaction de ma thèse. Je suis heureuse que nos chemins se soient croisés, ce qui m'a permis d'avoir dans ma vie la magnifique personne que tu es. Chaque jour à tes côtés me remplit de bonheur (et d'une énorme dose de rires). C'est bientôt à ton tour de passer par là et je serai à tes cotés comme tu l'as été pour moi. Je t'aime.

A mon grand-père,
A Cyrille,

Table des matières

Affidavit *2*

Liste de publications et participation aux conférences *3*

RÉSUMÉ *4*

ABSTRACT *5*

REMERCIMENTS *6*

TABLES DES FIGURES *11*

ABRÉVIATIONS *14*

INTRODUCTION *16*

Chapitre I : Le développement du cortex cérébral *17*

1. Le Néocortex **17**

1.1 Organisation anatomique générale du néocortex 17

1.2 Origine embryonnaire du cortex cérébral 19

2. Neurogenèse **21**

2.1 Les cellules piliers de l'architecture corticale 22

2.1.1 Les cellules neuroépithéliales et les cellules de la glie radiaire 22

2.1.2 Les cellules de Cajal-Retzius 25

2.1.3 Les neurones de la sous-plaque 26

2.2 Genèse des neurones glutamatergiques excitateurs 27

2.2.1 La Neurogenèse 27

2.2.2 Voies de signalisation et régulation moléculaire impliquées dans le destin cellulaire 30

2.2.2.1 La voie de signalisation Notch 31

2.2.2.2 La voie de signalisation Wnt 32

2.2.2.3 La voie de signalisation Sonic Hedgehog 33

2.2.2.4 Les profils d'expression moléculaire et transcriptomique 35

2.3 Genèse des interneurones inhibiteurs 39

3. Migration **40**

3.1. Migration des neurones glutamatergiques 40

3.1.1 La translocation somatique 42

3.1.2 La délamination 43

3.1.3 La migration et la transition multi-bipolaire 43

3.1.4 La locomotion 44

3.1.5 La translocation terminale 46

3.2 Migration des interneurones inhibiteurs 46

4. Maturation des neurones glutamatergiques **48**

4.1 Le prolongement axonal 48
4.1.1 L'axogenèse 48
4.1.2 Les projections axonales 50
4.2 La Dendritiogenèse 52
4.3 La Spinogenèse 54
4.4 La synaptogenèse 55

Chapitre II : Les hétérotopies nodulaires périventriculaires 58

1. Les malformations du développement cortical 58

1.1 MCD type II : Défaut de la migration neuronale 59

2. Les hétérotopies nodulaires périventriculaires 61

2.1 Le tableau clinique 61
2.2 Origines génétiques et mécanismes cellulaire et moléculaire associées au PVNH 63
2.3 Filamine-A 65
2.3.1 La structure de la *FLNA* 65
2.3.2 Les fonctions de la *FLNA* 66
2.4 Investigation d'un cas d'HNP à l'étiologie inconnue 70

Chapitre III : Les cadhérines atypiques FAT 73

1. La grande famille des cadhérines 73

1.1 Généralité sur les cadhérines 73
1.1.1 La structure des cadhérines 73
1.1.2 La superfamille des cadhérines 74
1.1.3 Les fonctions des cadhérines dans le développement 77

2. Les cadhérines atypiques FAT 80

2.1 Structure des cadhérines atypiques FAT 80
2.2 Fonction des cadhérines atypiques FAT 81
2.2.1 Partenaire d'interaction : les cadhérines atypiques Dachsous 81
2.2.2 La voie de signalisation HIPPO/Mst 82
2.2.3 Rôle des FAT dans le développement chez les vertébrés 84

3. La cadhérine atypique Fat1 86

3.1 Les multiples rôle de Fat1 dans le développement 87
3.1.1 La régulation de la prolifération et de la différenciation neurale 88
3.1.1.1 La voie de signalisation HIPPO/Mst 88
3.1.1.2 La voie de signalisation Wnt/β-caténine 89
3.1.2 La régulation de la motilité cellulaire 90
3.1.3 L'interaction Fat1-Fat4 dans le développement 90
3.2 Pathologies associées des mutations du gène *FAT1* 93

OBJECTIFS *96*

RESULTATS *99*

PARTIE I *100*

Partie I – Article 1 101

FLNA regulates neuronal maturation by modulating RAC1-cofilin activity in the developing cortex *101*

PARTIE II *130*

Partie II. 1 : Identification de variants faux sens dans le gène *FAT1* associée à une PVNH 131

Partie II. 2. Étude du profil d'expression de *Fat1* 133

Partie II.3 – Article 2 136

Atypical cadherin Fat1 regulates radial migration and morphology of newborn neurons in the developing cortex *136*

Partie II-4 – Est-ce que Fat1 régule la migration neuronale par la modulation de la voie HIPPO/Mst ? ... 179

DISCUSSION *183*

1. Les PVNH et altération du cortex normotopique **185**

1.1 Comment les neurones déficients s'intègrent dans le cortex et participent à la formation des réseaux ? 185

1.2 Quel lien entre *FAT1* et les MCD ? 188

2. Fat1 régule la migration neuronale et participe à la lamination corticale **191**

2.1 L'expression de Fat1 dans les structures cruciales à l'établissement cortical participe-t-elle à la régulation de la migration radiale ? 192

2.2 Par quelle voie de signalisation ou de partenaires d'interactions Fat1 régule la migration radiaire ? 195

2.3 Quel est l'impact d'une translocation terminale anormale des neurones glutamatergiques sur l'établissement cortical ? 198

Conclusions générales et perspectives **201**

ANNEXES *202*

Annexe 1 203

Inferring Ligand-Receptor Interactions between GABAergic and Glutamatergic *203*

BIBLIOGRAPHIE *235*

TABLES DES FIGURES

Figure 1 : Anatomie générale du cerveau humain et de la souris.

Figure 2 : Architecture du néocortex.

Figure 3 : La Neurulation.

Figure 4 : Développement du système nerveux central.

Figure 5 : Les cellules de la glie radiaire.

Figure 6 : La séparation de la pré-plaque initie la formation des couches corticales.

Figure 7 : La neurogenèse.

Figure 8 : Mode de division des cellules de la glie radiaire.

Figure 9 : Mouvement nucléaire intercinétique.

Figure 10 : La voie de signalisation Notch.

Figure 11 : La voie de signalisation Wnt.

Figure 12 : La voie de signalisation Shh.

Figure 13 : Les marqueurs de couches.

Figure 14 : Modèles de l'émergence de la diversité neuronale.

Figure 15 : Organisation moléculaire temporelle dans le néocortex de la souris.

Figure 16 : Zone de genèse et diversité des interneurones.

Figure 17 : Migration neuronale "inside-out".

Figure 18 : Les différentes étapes de la migration des neurones glutamatergiques.

Figure 19 : La locomotion.

Figure 20 : Migration tangentielle des interneurones.

Figure 21 : Le prolongement axonal.

Figure 22 : Le cône de croissance.

Figure 23 : Diversité des neurones de projection.

Figure 24 : La dendritogenèse.

Figure 25 : Les épines dendritiques.

Figure 26 : La synapse électrique et chimique.

Figure 27 : Le décours temporel des étapes de la corticogenèse.

Figure 28 : Classification des MCD.

Figure 29 : Les MCD de type II.

Figure 30 : Les hétérotopies nodulaires périventriculaires.

Figure 31 : La structure de la *FLNA*.

Figure 32 : La FLNA et les GTPases.

Figure 33 : Le cas clinique.

Figure 34 : La structure et les interactions des cadhérines.

Figure 35 : La superfamille des cadhérines.

Figure 36 : N-cadhérine et migration.

Figure 37 : Cadhérines et arborisation dendritique.

Figure 38 : La structure des FAT-cadhérines.

Figure 39 : La structure des Dachsous.

Figure 40 : La voie de signalisation HIPPO/Mst.

Figure 41 : L'expression de Fat1.

Figure 42 : Les partenaires d'interaction de FAT1 et leur rôle.

Figure 43 : FAT1 et la voie Hippo/Mst dans la prolifération et la différenciation cellulaire.

Figure 44 : Impact de la délétion de *Fat1*.

Figure 45 : Les voies de signalisation et les partenaires de *FAT1* et *FAT4*

Figure 46 : Les mutations sur le gène *FAT1*.

Figure 47 : Validation des mutations *FAT1* par la méthode de SANGER.

Figure 48 : Profil d'expression de *FAT1*.

Figure 49 : *Fat1* est exprimée dans la VZ/SVZ et la SP en embryonnaire.

Figure 50 : Validation des shRNA de Yap et Taz.

Figure 51 : Mise au point des shRNA de Yap et Taz par IUE.

Figure 52 : La délétion de Yap ou Taz combinée à celle de Fat1 ne restaure pas la migration radiaire à E18.5.

ABRÉVIATIONS

A

ABD : Domaine de liaison à l'actine
AJ : Jonctions adhérentes
APO : Aire préoptique
ApoER2 : Récepteur 2 Apolipoprotéine E

C

CalR : Calrétinine
CC : Cône de croissance
CGE : Éminences ganglionnaire caudale
CP : Plaque corticale
Cplx3 : Complexine 3
CPN : Neurone de projection calleuse
CRs : Cellules de Cajal-Retzius
CThPN : Neurone de projection cortico-thalamique
CX26 : Connexine-26
CX43 : Connexine-43

D

Dchs : Dachsous

E

EEG : Électroencéphalogramme

Ena/VASP : Mena/*Vasodilator-stimulated phosphoprotein*

F

F-actine : Filaments d'actine
FSHD : Dystrophies musculaires facio-scapulo-humérale
FZD : Récepteur *Frizzled*

H

EVH1 : ENA/VASP *Homology* 1

G

GliA : Protéine Gli activator

GPC3 : Glypican-3

I

IG : Immunoglobulines
IN : Interneurones
IP : Progéniteurs intermédiaires
IUE : Électroporation *in utero*
IZ : Zone intermédiaire

L

LGE : Éminences ganglionnaire latérale
LIS : Lissencéphalie
LR : Ligand-Récepteur

M

MAPs : Protéines associées aux microtubules
MCD : Malformations du développement cortical
MGE : Éminances ganglionaire médiane
MT : Microtubules
MZ : Zone marginale

N

NEPs : Cellules neuroépithéliales
NP : Plaque neurale
nSP : Neurones de la sous plaques

P

PCP : Polarité planaire
PP : Préplaque
Ptch : Récepteur Patched
PV : Parvalbumine

PVNH : Hétérotopies nodulaires périventriculaires

R

RGa : Cellules de la glie radiaire apicale
RGb : Cellules de la glie raidaire basale

S

scRNA-seq : *Single cell* RNA *sequencing*
SEEG : Stéréo-électroencéphalogramme
SBH : Hétérotopies en bande sous corticale
SCPN : Neurones de projection subcérébrale
Sema3A : Semaphorine 3A
SHH : *Sonic Hedgehog*
SMO : Récepteur Smoothened
SNP : Précurseurs neuronaux courts
SP : Sous plaque
SST : Somatostatine
SVZ : Zone sous ventriculaire

T

TAZ : coactivateur transcriptionnel avec motif de liaison PDZ
TBR2 : T-box protéine 2
TM : Domaine transmembranaire
TMB : Transition multipolaire-bipolaire
TSA : Trouble du spectre autistique

V

VIP : Protéines vasoactive intestinale
VLDLR : Récepteur *very low density lipoprotein*
VZ : Zone ventriculaire

Y

YAP : Protéine médiatrice Yes-associated

INTRODUCTION

Chapitre I : Le développement du cortex cérébral

1. Le Néocortex

Le cortex cérébral, également appelé néocortex ou isocortex, est le siège des hautes fonctions cognitives et motrices chez les mammifères. Il constitue la couche la plus externe des deux hémisphères cerveau, chacun de ces deux hémisphères étant subdivisés en aires corticales ayant des rôles spécifiques tels que la perception sensorielle, les émotions, le langage, la mémoire et la coordination du mouvement (Molnár et al., 2019). Le néocortex est composé d'une très grande diversité de neurones excitateurs, d'interneurones inhibiteurs ainsi que de cellules gliales. Les différentes populations neuronales et non-neuronales au sein du cortex sont très diverses et sont généralement classées en fonction de leurs propriétés morpho-fonctionnelles, de leur profil d'expression moléculaire et de leur localisation au sein du cortex (Telley et al., 2019). La genèse des différentes populations ainsi que leur positionnement au sein du cortex est un processus finement régulé à la fois spatialement et temporellement durant le développement embryonnaire et post-natal.

1.1 Organisation anatomique générale du néocortex

Le cortex cérébral est une structure organisée et régionalisée, où chaque zone distincte est spécialisée dans des fonctions précises. Chez l'Homme, le cerveau est divisé en quatre lobes : le lobe frontal, le lobe pariétal, le lobe occipital et le lobe temporal. Chacunes de ces régions contiennent des aires corticales associées à des fonctions précises. Au sein de cette thèse nous allons principalement nous intéresser à l'aire somatosensorielle primaire située dans le lobe pariétal chez l'Homme et dans la région dorsolatérale chez la souris (Figure 1). Cette aire permet l'intégration et la perception des informations sensorielles périphériques, la consolidation de la mémoire motrice ainsi que la coordination motrice. Cette structure organisée est très largement décrite chez l'Homme ainsi que chez le rongeur et partage des fonctions similaires chez les deux espèces.

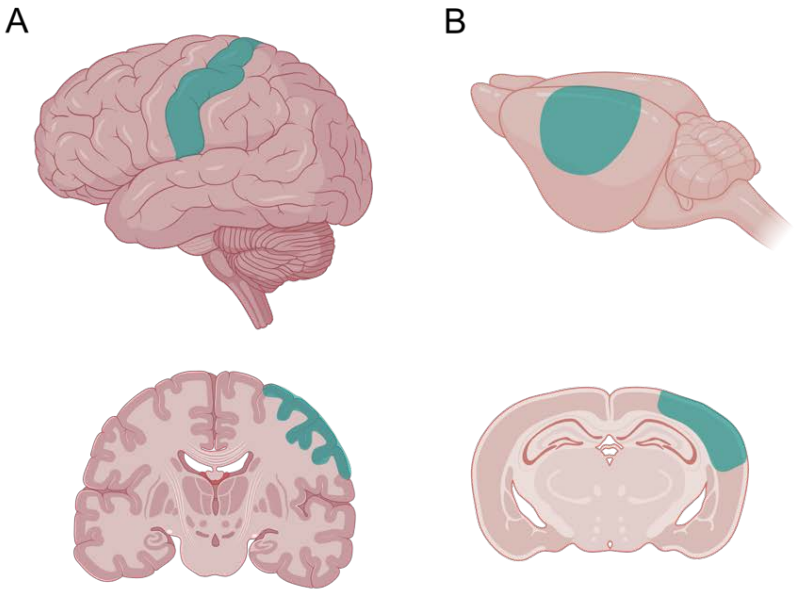


Figure 1. Anatomie générale du cerveau humain et de la souris. (A) Schéma d'un cerveau gyrencéphale humain en vue latérale et en coupe coronale avec l'aire somatosensorielle identifiée en vert. (B) Schéma d'un cerveau lissencéphale de souris en latérale et en coupe coronale avec l'aire somatosensorielle identifiée en vert.

Chez l'Homme, les primates et certains mammifères, le cortex cérébral est caractérisé par la présence de replis nommés gyri et de sillons nommés sulci (Figure 1). Ces circonvolutions, chez les espèces nommées gyrencéphales, permettent d'augmenter considérablement la surface du néocortex, indispensable pour l'établissement des fonctions complexes (Massimo & Long, 2022). Chez l'Homme les circonvolutions apparaissent durant la 13ème et 14ème semaine de gestation (Dubois et al., 2008). À l'inverse, chez les rongeurs et certains petits mammifères, le néocortex est lisse (Figure 1). Malgré cette différence, de grandes similitudes dans les principes de bases et les processus cellulaires du développement cortical sont partagés entre ces espèces, ce qui fait des rongeurs comme la souris, un modèle de choix dans l'étude des Neurosciences (Molnár et al., 2019).

De plus, le néocortex présente une cytoarchitecture complexe organisée en colonnes corticales et en six couches qui se forment selon un processus « inside-out » (Figure 2). Cette disposition est conservée à travers les espèces gyrencéphales et lissencéphales.

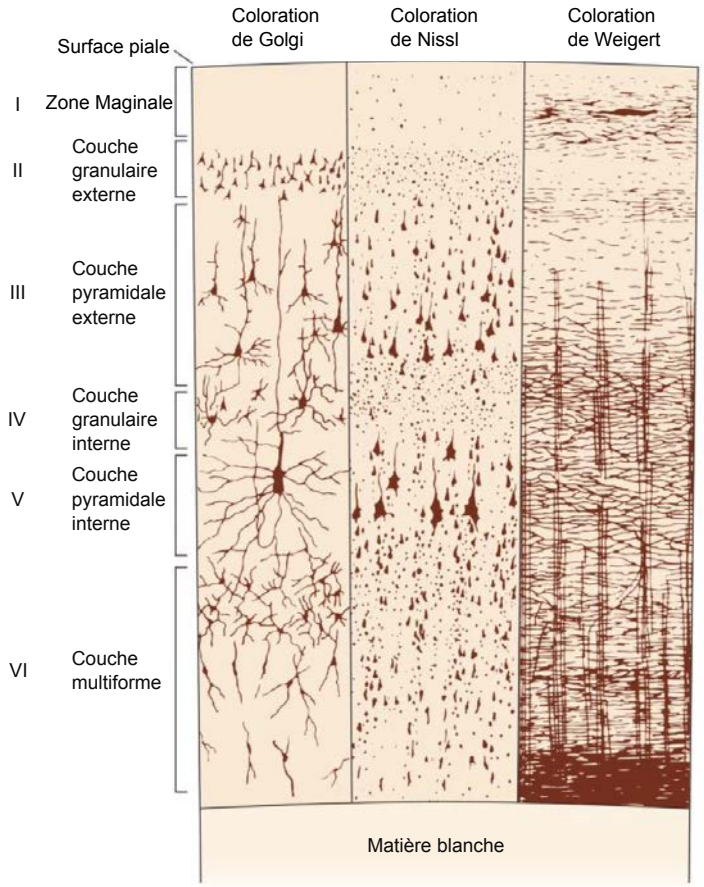


Figure 2. Architecture du néocortex. Schéma représentant les différentes couches corticales à l'aide de différents marquages histologiques permettant de visualiser les différents types neuronaux (coloration de Golgi et de Nissl) et les fibres de myéline (coloration de Weigert). Adapté *de Kandel et al., 2013, Principles of Neural Sciences, Fifth Edition.*

1.2 Origine embryonnaire du cortex cérébral

Le développement embryonnaire ou embryogenèse, consiste en une séquence d'étapes développementales précises. La gastrulation est une phase fondamentale de l'embryogenèse animale. Elle permet la spécification et le réarrangement des couches germinales primaires, établissant les bases de l'architecture corporelle et des futurs organes. Ce processus fondamental façonne les trois couches germinales principales : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme (Solnica-Krezel & Sepich, 2012). Chacune de ces couches permet de créer l'organisation interne et externe d'un individu en développement. Le mésoderme et l'endoderme vont devenir le squelette, les muscles, les organes et le tract gastro-intestinal tandis que l'ectoderme va devenir entre autres le système nerveux central et périphérique. L'embryogenèse se poursuit avec l'étape de la neurulation lors de laquelle, l'ectoderme s'épaissit et devient la plaque neurale (NP). La NP va s'invaginer afin de créer les crêtes neurales qui s'élèvent au niveau de la ligne

médiane dorsale. Puis, les extrémités de ces crêtes vont fusionner pour former le tube neural (Nikolopoulou et al., 2017 ; Figure 3).

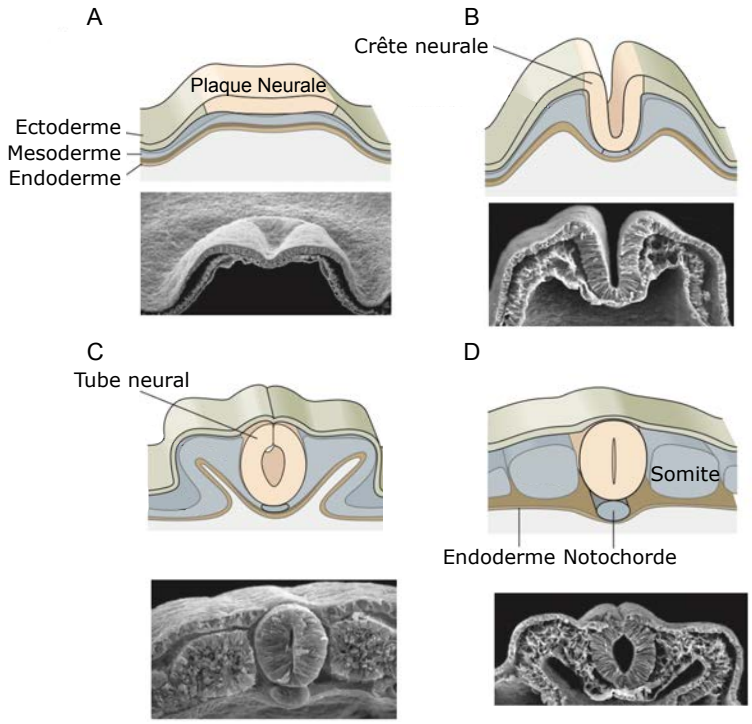


Figure 3. La Neurulation. Les différentes étapes du processus de neurulation permettant la formation du tube neural. (A) Au début de la gastrulation trois couches de cellules germinales sont formé à savoir l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. C'est l'ectoderme qui donne naissance à la plaque neurale, précurseur du système nerveux central. (B) La plaque neurale s'invagine pour former le sillon neural, et les crêtes neurales s'élèvent. (C) La fusion des crêtes neurales permet la formation du tube neural. (D) Le tube neural repose sur la notochorde. Il est entouré des somites, des cellules mésodermiques qui donnent naissance aux muscles et au cartilage. Adapté *de Kandel et al., 2013, Principles of Neural Sciences, Fifth Edition.*

Par la suite, le tube neural se subdivise en trois vésicules : le prosencéphale (cerveau antérieur), le mésencéphale (cerveau médian) et le rhombencéphale (cerveau postérieur) (Figure 4). Ces trois vésicules vont former les différentes parties du cerveau. Le prosencéphale se divise en diencéphale et en télencéphale. Le télencéphale se subdivise également en deux régions distinctes : le pallium et le subpallium. Le subpallium devient par la suite les ganglions de la base, l'amygdale et les éminences ganglionnaires médiale et latérale (MGE ; LGE ; Moreno et al., 2009). Les MGE et les LGE sont les zones de genèse des interneurones inhibiteurs corticaux. Le pallium quant à lui va former l'hippocampe, le cortex olfactif et le néocortex (Marín & Rubenstein, 2003). Le pallium est la zone de genèse des neurones de projections – neurones excitateurs – du cortex durant le développement embryonnaire. Le mésencéphale va former le cerveau

médian. Enfin, le rhombencéphale forme les structures du cerveau postérieur : le cervelet, le pont et la moelle épinière.

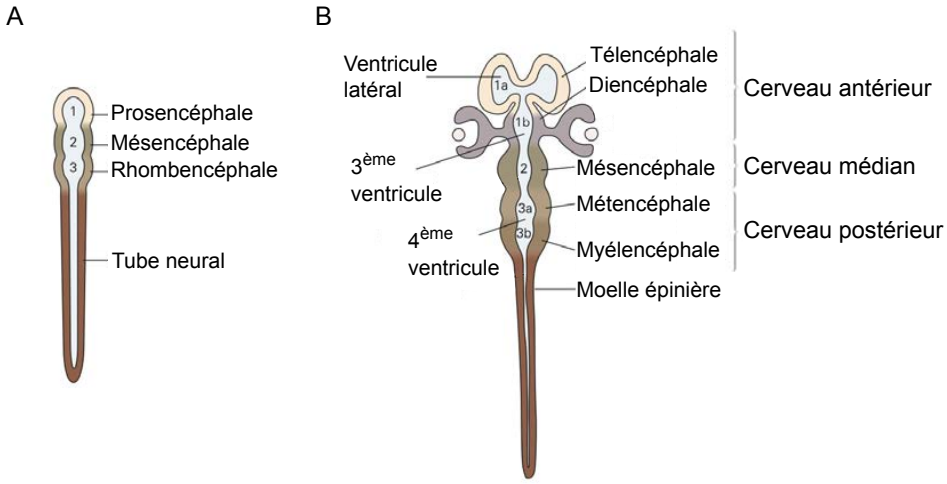


Figure 4. Développement du système nerveux central. (A) Le tube neural se subdivise en trois vésicules cérébrales primaires : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. (B) Ces trois vésicules se subdivisent à nouveau en cinq vésicules, qui vont venir former le cerveau antérieur (thalamus, hypothalamus, rétine et hémisphère cérébraux du cortex), le cerveau médian et le cerveau postérieur (pont, médulla et cervelet). Adapté *de Kandel et al., 2013, Principles of Neural Sciences, Fifth Edition.*

Lors du développement embryonnaire, une fois les zones du système nerveux central définies, le développement du cortex débute. Il repose sur trois étapes fondamentales qui sont la neurogenèse, la migration et la maturation. Ces étapes sont essentielles pour assurer la formation et la mise en place du nombre adéquat de neurones, répartis dans l'ensemble des couches corticales. Dans la suite de ce chapitre, je vais décrire ces étapes clés du développement cortical chez la souris, modèle que j'ai utilisé tout au long de cette thèse.

2. Neurogenèse

Une fois le pallium et le subpallium formés, le processus de neurogenèse commence. Ce processus régulé permet de générer l'intégralité des cellules neuronales et non-neuronales composant le cortex. Les trois premiers types cellulaires générés soutiennent de manière substantielle la formation du néocortex. En revanche, la plupart subissent une mort cellulaire programmée une fois celui-ci formé. Dans les paragraphes

qui suivent, je détaillerai en premier lieu leur formation et leur rôle, puis je décrirai le processus de neurogenèse des neurones excitateurs et inhibiteurs.

2.1 Les cellules piliers de l'architecture corticale

2.1.1 Les cellules neuroépithéliales et les cellules de la glie radiaire

Au stade embryonnaire E9 chez la souris, le pallium est majoritairement composé de cellules neuroépithéliales (NEPs) qui sont des cellules pluripotentes. Cela signifie qu'elles ont la capacité de générer différents types cellulaires. A ce stade, la plaque neurale est constituée d'une seule couche de NEPs qui forme le neuroépithélium, une couche pseudostratifiée. Les NEPs sont des cellules polarisées selon un axe apico-basal et connectées entre elles par des jonctions serrées, constituées principalement d'occludine (Furuse et al., 1993 ; Götz & Huttner, 2005). Elles expriment des marqueurs cellulaires tels que Nestine, Sox2 et Notch (Penisson et al., 2019). Ces cellules se divisent symétriquement afin d'élargir la population de cellules progénitrices et asymétriquement pour générer une cellule progénitrice et un neurone (Götz & Huttner, 2005 ; Huttner & Brand, 1997). Aux alentours de E10.5, les NEPs se différencient en cellules de la glie radiaire apicale (RGa), ce qui marque le début de la neurogenèse (Misson et al., 1988). Cette transition est marquée par le remplacement des jonctions serrées par des jonctions adhérentes (AJ) formées principalement par les cadhérines (voir Chapitre III ; Aaku-Saraste et al., 1996 ; Arellano et al., 2021 ; Yoshida-Noro et al., 1984). Cette transition est accompagnée par une augmentation de Fgf10, un récepteur exprimé par les NEPs, qui entraîne la différenciation des NEPs en RGa (Sahara & O'Leary, 2009).

Les RGa deviennent alors la population majoritaire de cellules progénitrices au sein du pallium. Elles expriment des marqueurs communs avec les NEPs tels que la Nestine et SOX2 mais se distinguent de ceux-ci par l'expression de marqueurs astrocytaires tels que Glast, Blbp, Gfap, vimentin et Pax6 (Götz & Huttner, 2005 ; Penisson et al., 2019). Ce sont des cellules polarisées, dotées d'un prolongement apical et basal, dont le soma est proche de la zone ventriculaire (VZ). Elles possèdent un pied apical ancré par le complexe protéique de polarité CRUMBS–PALS1–PATJ au niveau de la VZ (Chou et al., 2018). Elles possèdent également un pied basal ancré par des intégrines-laminines au niveau de la zone marginale (MZ) (Chou et al., 2018 ; Ferent et al., 2020 ; Loulier et al., 2009). Les RGa interagissent avec leur environnement via la matrice extracellulaire, mais également entre elles via les AJ (Ferent et al., 2020). Le transport apical post-Golgien est

essentiel à la stabilisation AJ entre les RGa (Brault et al., 2022 ; Brault et al., 2023). La GTPases RAB6 contrôle le trafic entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique, contribuant ainsi à la stabilisation et au maintien des AJ entre les RGa (Brault et al., 2022). De plus, RAB6 et les dynéines favorisent le transport apical polarisé du complexe Crumbs, nécessaire au maintien des AJ entre les RGa (Brault et al., 2022). Les AJ sont également composées de N-cadhérines qui sont des protéines transmembranaires qui permettent les interactions avec les cellules voisines (Takeichi, 1977 ; Yoshida-Noro et al., 1984). Les cadhérines sont capables de réaliser des liaisons homophiliques, c'est-à dire une liaison entre deux protéines identiques, avec une N-cadhérine d'une cellule adjacente. Leur domaine intracellulaire se lie à la β-caténine et la α-caténine (Nagafuchi et al., 1991 ; Ozawa & Kemler, 1992 ; Shapiro & Weis, 2009). Ces deux dernières ont la capacité de se lier au cytosquelette d'actine et faciliter la communication intercellulaire (Ferent et al., 2020 ; Shapiro & Weiss, 2009 ; Figure 5). Les RGa sont des cellules pluripotentes, elles ont la capacité de générer plusieurs types cellulaires tels que des progéniteurs intermédiaires, des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes. Grâce à cette propriété, les RGa ont la capacité de générer une majorité de cellules qui formeront le cortex, ce qui font d'elles des cellules essentielles à la neurogenèse. De plus, elles jouent un rôle notable dans les processus de migration radiale. Elles servent d'échafaudage aux neurones en migration, leur permettant de se positionner au sein du cortex (Voir 3.1. La migration des neurones glutamatergiques). Les RGa, par leurs rôles essentiels dans divers processus indispensables au développement, sont ainsi des cellules piliers à l'établissement du cortex.

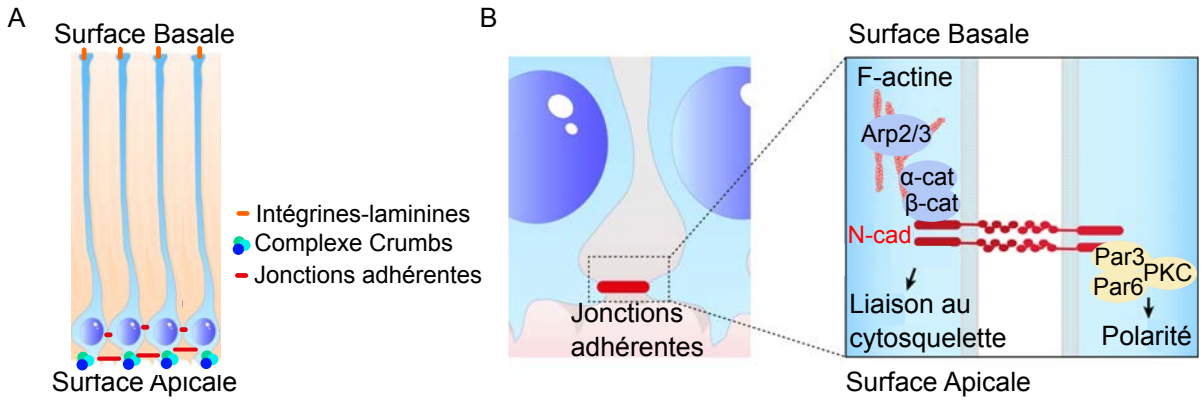


Figure 5. Les cellules de la glie radiaire. (A) Schéma représentant les RGa ancrées aux surfaces apicale et basale et reliées par des AJ. (B) Schéma des AJ entre les RGa. Les liaisons N-cadhérines permettent de relier des contacts extracellulaires entre deux RGa avec le cytosquelette d'actine (via la β-caténine) ou avec des protéines de polarité (Par3, Par6, PKC). Adapté de *Ferent et al., 2020.*

Le développement de la lamination corticale est initié lors de la séparation à E13.5 d'une couche de neurones pionniers appelées la préplaque (PP ; Figure 6). La PP est une structure transitoire qui se situe en dessous des méninges et apparait aux alentours de E12.5 chez la souris (Aboitiz et al., 2005 ; Olson, 2014). A ce stade, le néocortex est composé de deux zones : la VZ en apical et la PP en basal. La PP est composée des premières cellules neuronales issues des NEPs à savoir des neurones de Cajal-Retzius (CRs) et des neurones de la sous plaques (nSP). La séparation de la PP permet de définir la MZ (la future couche I) et la sous plaque (SP ; future couche VI) qui cloisonnent une nouvelle structure qui est la plaque corticale (CP) (Aboitiz et al., 2005 ; Olson, 2014 ; Figure 6). C'est au sein de la CP que les neurones vont migrer pour venir former les couches VI à II selon un processus inside-out. La division de la PP est donc la première étape majeure de la formation du cortex en couches. De plus, les neurones pionniers, à savoir les CR et les nSP, vont jouer des rôles indispensables à l'établissement de l'architecture corticale.

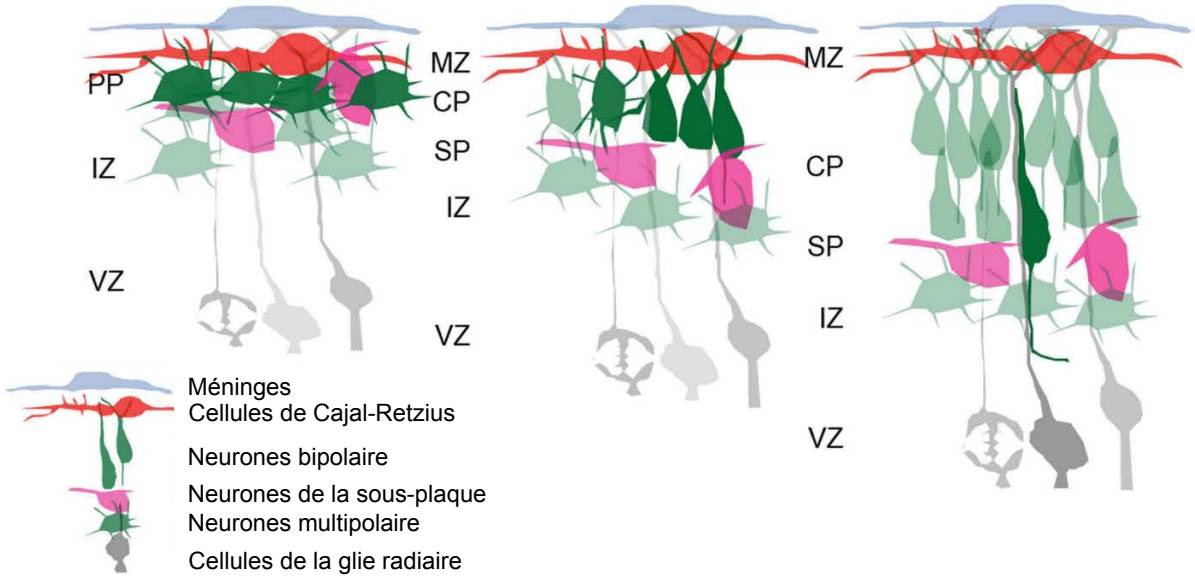


Figure 6. La séparation de la pré-plaque initie la formation des couches corticales. Schématisation (de gauche à droite) de la PP. Par la suite, la PP se sépare ce qui crée la CP cloisonnée par la MZ et SP. Ensuite, les neurones en migration viennent s'établir au sein de la CP en s'empilant les uns sur les autres. Abréviations : PP : pré-plaque, IZ : zone intermédiaire, VZ : zone ventriculaire, MZ : zone marginale, CP : plaque corticale, SP : sous-plaque. Adapté de *Olson, 2014.*

2.1.2 Les cellules de Cajal-Retzius

Les premiers neurones générés sont les cellules de Cajal Retzius (CRs) qui apparaissent aux alentours de E9.5 chez la souris. Les CRs sont des neurones glutamatergiques transitoires qui se situent à la surface du cortex en développement (Marín-Padilla, 1998). Les CRs sont des générées dans des zones distinctes, à savoir du septum, des éminences thalamiques, de l'ourlet cortical (*cortical hem*) et du pallium ventral (Bielle et al., 2005 ; Causeret et al., 2021 ; Elorriaga et al., 2023 ; Hevner et al., 2005). Une fois générées, les CRs migrent de leur zone de genèse jusqu'à la PP de manière tangentielle entre E10.5 et E12.5 (Barber & Pierani, 2016 ; Bielle et al., 2005). Lors de la division de la PP, ils se retrouvent dans la MZ qui correspond à la future couche I du néocortex (Barber & Pierani, 2016 ; Elorriaga et al., 2023). Lors de leur migration jusqu'à leur position finale, les CRs expriment Cxcr4 et Cxcr7, des récepteurs à la chimiokine Cxcl12 qui est exprimée par les méninges (Trousse et al., 2015). Cette interaction permet de positionner les CR au sein de la MZ (Trousse et al., 2015). De plus, un mécanisme complémentaire de répulsion entre les CRs via les Eph/Ephrines se met en place permettant de tapisser de manière homogène la surface télencéphalique (Villar-Cerviño et al., 2013 ; Barber & Pierani, 2016). Une fois localisées dans la MZ, les CR acquièrent leur morphologie terminale. Elles présentent un soma ovoïde, un axone et une arborisation dendritique située de part et d'autre, et confinée principalement dans la MZ (Anstötz et al., 2014). Malgré leur grande hétérogénéité, toutes les CRs sécrètent la Reelin, une glycoprotéine de la matrice extracellulaire. La Reelin joue un rôle dans le guidage des neurones en migration et est nécessaire à l'établissement de la lamination corticale (D'Arcangelo et al., 1995 ; Ogawa et al., 1995). Les CRs sont des neurones transitoires, la plupart disparaissent à la fin du développement cortical par mort cellulaire programmée. Seule une faible proportion, inférieure à 3% survit à l'âge adulte (Causeret et al., 2021 ; Chowdhury et al., 2010). Cette mort cellulaire programmée est médiée par l'activité neuronale (Riva et al., 2019). De plus, la mort cellulaire des CR est nécessaire à l'établissement d'une morphologie et d'une connectivité correctes des neurones corticaux des couches II/III (Riva et al., 2019). Ainsi, les CRs, grâce à leur répartition homogène au sein de la MZ, sont les principaux contributeurs à l'établissement des six couches du néocortex durant le développement embryonnaire (Alvarez-dolado, 2022 ; D'Arcangelo, 2005 ; Meyer et al., 2004).

2.1.3 Les neurones de la sous-plaque

Dans un second temps, entre E10.5 et E12.5 chez la souris, les nSP sont générés. Ces neurones présentent une grande diversité par leur morphologie axonale et dendritique, leurs propriétés fonctionnelles et moléculaires ainsi que par les marqueurs spécifiques exprimés (Chang et al., 2024 ; Luhmann et al., 2018). Les nSP peuvent être des neurones glutamatergiques ou GABAergiques. Ils expriment également une grande diversité de gènes marqueurs mais la majorité exprime Nurr1 (*Orphan nuclear receptor 1*), Ctgf (*connective tissue growth factor*) et Complexine 3 (Cplx3) (Arimatsu et al., 2003 ; Chang et al., 2024 ; Wang et al., 2011). Cette grande hétérogénéité suggère que les nSP supportent un grand nombre de fonctions et qu'ils sont propres aux mammifères (Montiel et al., 2011 ; Ohtaka-Maruyama, 2020). La majorité de ces cellules sont générées dans la VZ par la division des NEPs, mais une proportion provient également des progéniteurs intermédiaires et d'autres structures tels que la paroi télencéphalique médiane et les éminences ganglionnaires (Luhmann et al., 2018 ; Ohtaka-Maruyama, 2020). Les nSP issus du pallium migrent de manière radiale, le long des RGa. Ceux provenant des régions plus éloignées, migrent de manière tangentielle afin de se répartir au sein de la SP (Ohtaka-Maruyama, 2020). Ces neurones ont des propriétés électrophysiologiques de neurones matures (Luhmann et al., 2018). La SP est la première zone corticale à être contactée par des entrées synaptiques en provenance du thalamus (Luhmann et al., 2018). Les nSP jouent un rôle clé dans le développement cortical précoce, notamment dans les processus de migration radiaire, la transition multi-bipolaire, la maturation des circuit neuraux et la plasticité (Luhmann et al., 2018 ; Ohtaka-Maruyama, 2020 ; Ohtaka-Maruyama et al., 2018). La SP est une structure transitoire, présente précocement des stades embryonnaires jusqu'au premières semaines postnatales durant le développement cortical (Chang et al., 2024 ; Feldmeyer, 2023). Suite à une mort cellulaire programmée intervenant aux stades postnataux, seule une minorité de neurones composant la SP survivent et forment la couche 6b (Chang et al., 2024 ; Feldmeyer, 2023). Cette couche se situe dans la transition entre la matière blanche et le néocortex et elle est considérée comme un vestige de la SP à l'âge adulte. Elle se distingue de la couche 6a par l'expression de marqueurs spécifiques mais également car elle est composée d'une bande de quelques neurones dont les axones projettent horizontalement (Feldmeyer, 2023). La couche 6b participe au renforcement des entrées thalamo-corticales qui innervent la

couche IV et participe au développement de l'organisation du cortex à baril dans le S1 (Tolner et al., 2012).

2.2 Genèse des neurones glutamatergiques excitateurs

2.2.1 La Neurogenèse

Aux alentours de E11.5 chez la souris, le processus de neurogenèse commence, marqué par la transition des NEPs en RGa. Cette étape cruciale permet de générer l'intégralité des neurones glutamatergiques peuplant le néocortex (Figure 7). La majorité des neurones corticaux sont issus des RGa au sein du pallium. Les RGa sont des cellules multipotentes capables de générer, lors de leur division, différentes lignées cellulaires. Les RGa ont la capacité de produire par neurogenèse « directe » des neurones post-mitotiques et par neurogenèse « indirecte » des progéniteurs intermédiaires qui pourront à leur tour donner naissance à deux neurones.

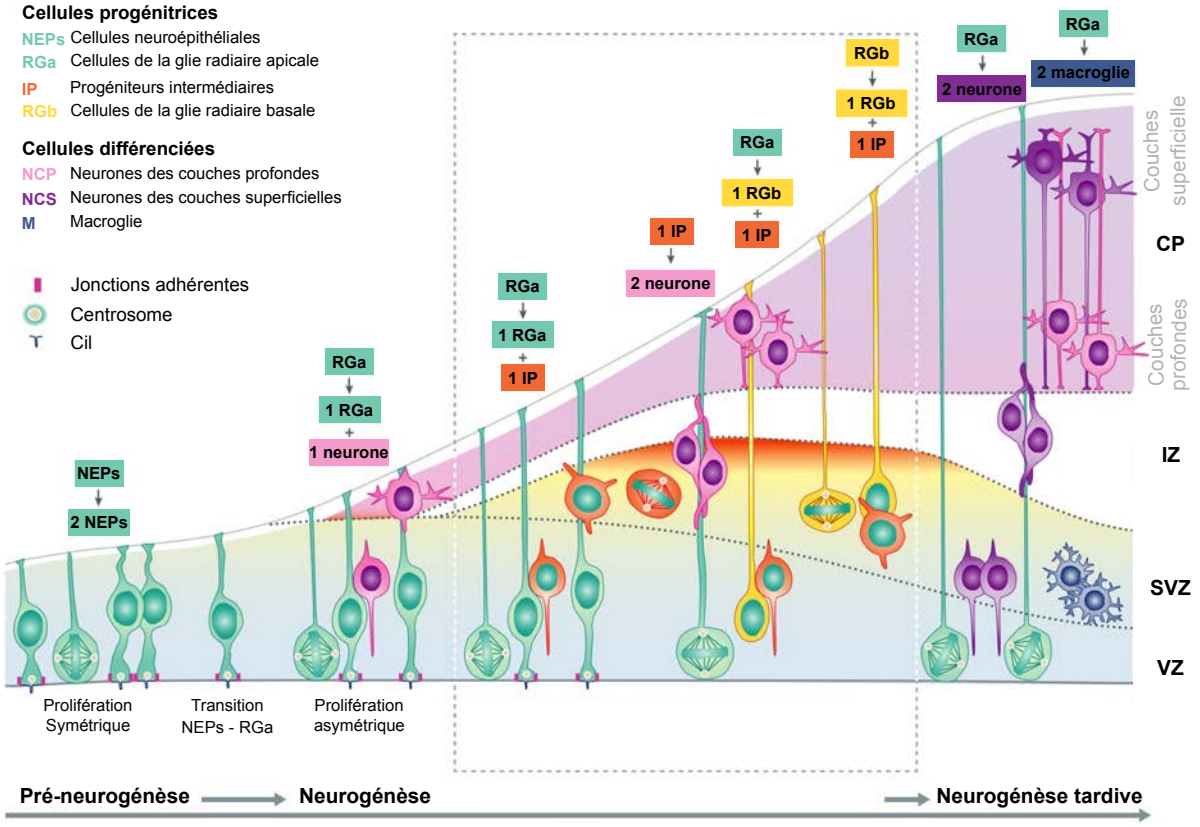


Figure 7. La neurogenèse. Schématisation globale des différentes étapes de la neurogenèse et de la gliogenèse permettant de former les couches corticales selon un processus « inside-out » Abréviations : VZ : zone ventriculaire, SVZ : zone sous ventriculaire, Iz : zone intermédiaire, CP : plaque corticale. Adapté de *Paridaen & Huttner, 2014.*

Les RGa peuvent se diviser symétriquement et asymétriquement, ce processus repose, entre autres, sur l'orientation du fuseau mitotique lors de la division (Götz & Huttner, 2005 ; Lancaster & Knoblich, 2012 ; Villalba et al., 2021 ; Figure 8). Durant la division cellulaire, l'orientation du plan de clivage mitotique joue un rôle déterminant dans la destinée de la descendance de la cellule. Durant les étapes les plus précoces, le plan de clivage est vertical par rapport à la VZ ce qui conduit à des divisions symétriques. Ces divisions permettent de produire deux cellules progénitrices et ainsi d'augmenter la population de RGa (Lancaster & Knoblich, 2012 ; Smart, 1973). Puis, aux les stades ultérieurs de la neurogenèse, les plans de clivage deviennent obliques et horizontaux. Cette orientation favorise les divisions asymétriques, ce qui produit une RGa et un progéniteur ou un neurone (Chenn & McConnell, 1995 ; Lancaster & Knoblich, 2012). En revanche, bien que durant les étapes précoces du développement les divisions verticales des RGa soient symétriques, il a été démontré que durant les phases plus tardives les RGa pouvaient être clivées verticalement et réaliser une division asymétrique (Lancaster & Knoblich, 2012 ; Noctor et al., 2008). Ainsi, la relation entre plan de clivage et la destinée cellulaire est loin d'être élucidée mais l'orientation du fuseau mitotique influence malgré tout le type de division (Villalba et al., 2021). Cependant, il est important de souligner que la destinée cellulaire ne repose pas exclusivement sur l'orientation du fuseau mitotique, elle est aussi régulée par des protéines de polarité et de nombreuses voies de signalisation.

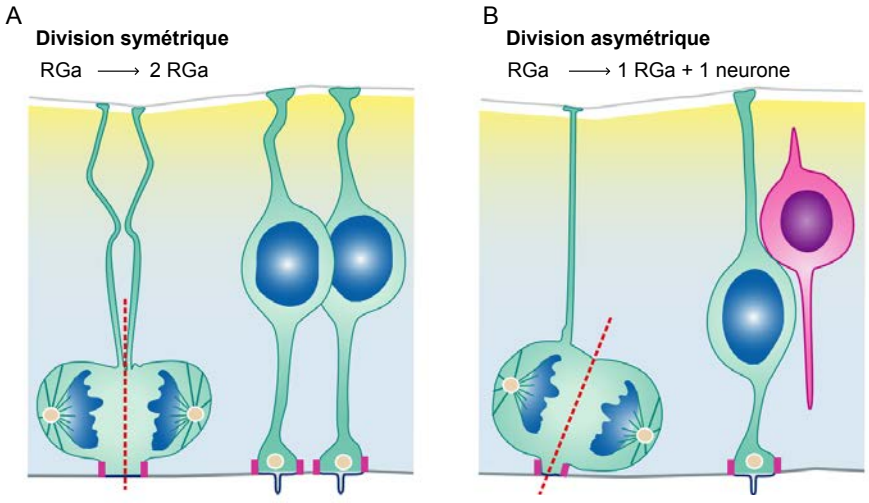


Figure 8. Mode de division des cellules de la glie radiaire. Schématisation du mode de division symétrique (A) et asymétrique (B) des RGa. Abréviations : RGa : cellules de la glie radiaires. Adapté de *Paridaen & Huttner, 2014.*

Il existe trois types de progéniteurs intermédiaires : les précurseurs neuronaux courts (SNP), les progéniteurs intermédiaires (IP) et les glies radiaires basales (RGb). L'intégralité de ces progéniteurs ont la capacité de générer deux neurones corticaux par division asymétrique (Hevner, 2019 ; Noctor et al., 2008 ; Penisson et al., 2019 ; Stancik et al., 2010 ; X. Wang et al., 2011). Les SNP sont des cellules localisées dans la VZ possédant un pied apical et un pied basal court et qui expriment la tubulinα-1 (Stancik et al., 2010). Ils se distinguent des RGa par une phase G1 du cycle cellulaire plus longue liée à une neurogenèse directe (Stancik et al., 2010). Les SNP vont principalement générer les neurones glutamatergiques des couches II/III et IV (Stancik et al., 2010). Les IP possèdent seulement un pied apical et sont localisés dans la zone sous-ventriculaire (SVZ). Ils se différencient des autres populations par l'expression d'un facteur de transcription T-box (TBR2). Les IP ont un potentiel de prolifération limité, ils peuvent réaliser seulement des divisons symétriques neurogéniques dans la SVZ (Noctor et al., 2004 ; Taverna et al., 2014). Ils génèrent la majorité des neurones des couches II-VI (Hevner, 2019). Les RGb ne possèdent qu'un long pied basal et sont localisées dans la SVZ. Ces cellules se trouvent principalement chez les espèces gyrencéphales telles que les primates et le furet (Penisson et al., 2019). Cela suggère que leur rôle est important dans l'apparition des gyri et sulci. Cependant, des études ont mis en avant qu'elles étaient également présentes chez certaines espèces lissencéphales comme la souris, mais en nombre plus restreint (Wang et al., 2011). Les RGb présentent les mêmes caractéristiques que les RGa et expriment SOX2, PAX6 et la vimentine (Wang et al., 2011). De plus, une proportion des RGb exprime HOPX, un marqueur présent chez l'Homme, dans le néocortex médian en développement (Vaid et al., 2018).

Lors de leur division, les RGa tout comme les NEPs, effectuent un mouvement oscillatoire du noyau entre la surface basale et apicale au cours du cycle cellulaire (Sauer, 1935). Ce mouvement, qualifié de migration nucléaire intercinétique est synchronisé avec le cycle cellulaire. La mitose se produit à la surface ventriculaire, puis lors de la phase G1 le noyau entame une nucléokinèse et la phase S a lieu dans la SVZ. Ensuite, lors de la phase G2 le noyau redescend vers la surface ventriculaire avant d'entamer à nouveau une mitose (Bertipaglia et al., 2018 ; Götz & Huttner, 2005 ; Tsai et al., 2010 ; Figure 9). Cette migration intercinétique est contrôlé par le cytosquelette de microtubules (MT) ainsi que par des protéines motrices associées aux MT qui permettent au noyau de se déplacer au sein de la cellule (Tsai et al., 2010). Les MT sont orientées unidirectionnellement au sein des RGa. La kinésine Kif1A permet la migration basale du noyau, vers la SVZ, en le déplaçant vers

les extrémités « plus » des MT (Tsai et al., 2010 ; Figure 9). À l'inverse les dynéines cytoplasmiques contrôlent l'impulsion de la migration apicale, vers la VZ, durant la phase G2 et l'entrée dans la phase de mitose (Hu et al., 2013). Cdk1 joue un rôle dans la régulation de la migration nucléaire apicale en favorisant le recrutement des dynéines au niveau de l'enveloppe nucléaire (Baffet et al., 2015 ; Figure 9).

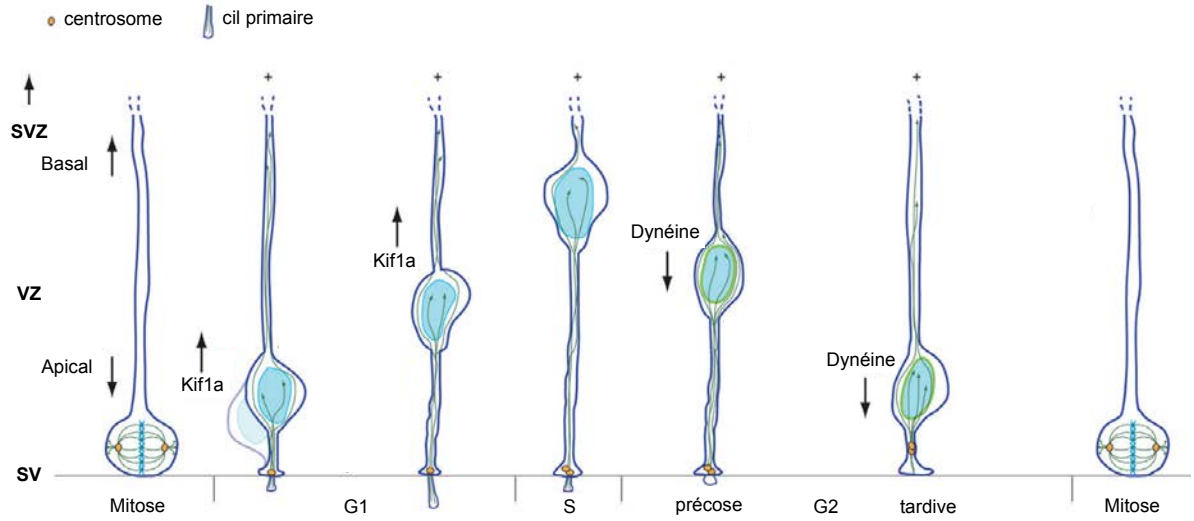


Figure 9. Mouvement nucléaire intercinétique. Schématisation du mouvement nucléaire intercinétique lors de la division d'une RGa. Abréviations : SV : surface ventriculaire, VZ : zone ventriculaire, SVZ : zone sous ventriculaire. Adapté de *Bertipaglia et al., 2018.*

Lors des phases de neurogenèse tardive, les différentes populations de progéniteurs entament leurs dernières divisions neurogéniques pour peupler les couches les plus superficielles du cortex. Les derniers cycles de division des RGa sont des divisions symétriques terminales qui permettent de générer les cellules gliales du cortex. La diversité de tous les progéniteurs neuronaux, combinée à la régulation précise des processus de prolifération par des voies de signalisation, permet de générer la pluralité des types neuronaux peuplant le néocortex adulte.

2.2.2 Voies de signalisation et régulation moléculaire impliquées dans le destin cellulaire

La balance entre prolifération et différenciation neuronale est modulée par divers facteurs qui orchestrent la neurogenèse et le destin cellulaire. Dans cette partie, je détaillerai plus particulièrement les voies de signalisation intracellulaires, leurs partenaires, les signaux diffusibles ainsi que les facteurs de transcription majeurs

impliqués dans la détermination du destin cellulaire. En régulant finement la neurogenèse, ces facteurs assurent non seulement un *timing* précis et coordonné du développement neuronal, mais ils contribuent également à la diversité des types neuronaux générés.

2.2.2.1 La voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch est conservée à travers les espèces, c'est une voie majeure impliquée dans le destin cellulaire durant la neurogenèse. Notch est un récepteur transmembranaire, il existe quatre paralogues chez les mammifères ayant des structures similaires mais des fonctions et des partenaires différents (Mase et al., 2021). Les ligands du récepteur Notch sont Delta et Jagged, qui par liaison avec des cellules adjacentes permettent d'activer la voie de signalisation (Fleming, 1998). Une fois activé, le récepteur Notch est clivé sur quatre sites protéolytiques (S1-4) et des fragments NICD (« *Notch intracellular domain* ») sont relargués. Ces fragments vont transloquer dans le noyau et entraîner la transcription des gènes *Hes*. Ces derniers vont venir réprimer l'expression des gènes proneuronaux *bHLH* (« *basic helix-loop-helix* ») tels que *Ngn2* et *Asc1*, permettant ainsi aux RGa de rester dans un état prolifératif (Nian & Hou, 2022 ; Paridaen & Huttner, 2014 ; Figure 10). De plus, il a été démontré que Notch joue un rôle dans la différenciation. Lors de la division asymétrique des RGa, une des cellules filles va exprimer de manière plus élevée Notch et Par3. Par3 promeut l'activité de Notch ce qui va favoriser le renouvellement d'une RGa (Bultje et al., 2009). À l'inverse, l'autre cellule fille exprime moins Notch et Par3, mais plus fortement le ligand Delta et des gènes pro-neuronaux. Cela va initier sa délamination ainsi que sa différenciation cellulaire (Bultje et al., 2009 ; Dong et al., 2012 ; Paridaen & Huttner, 2014 ; Figure 10). Ainsi, la voie de signalisation Notch est une voie majeure dans l'équilibre de l'auto-renouvellement de la glie radiaire et de la différenciation neuronale (Gaiano et al., 2000 ; Mase et al., 2021). La voie Notch influence le destin cellulaire et régule spatialement et temporellement la génération des différents types neuronaux peuplant le cortex (Dong et al., 2012).

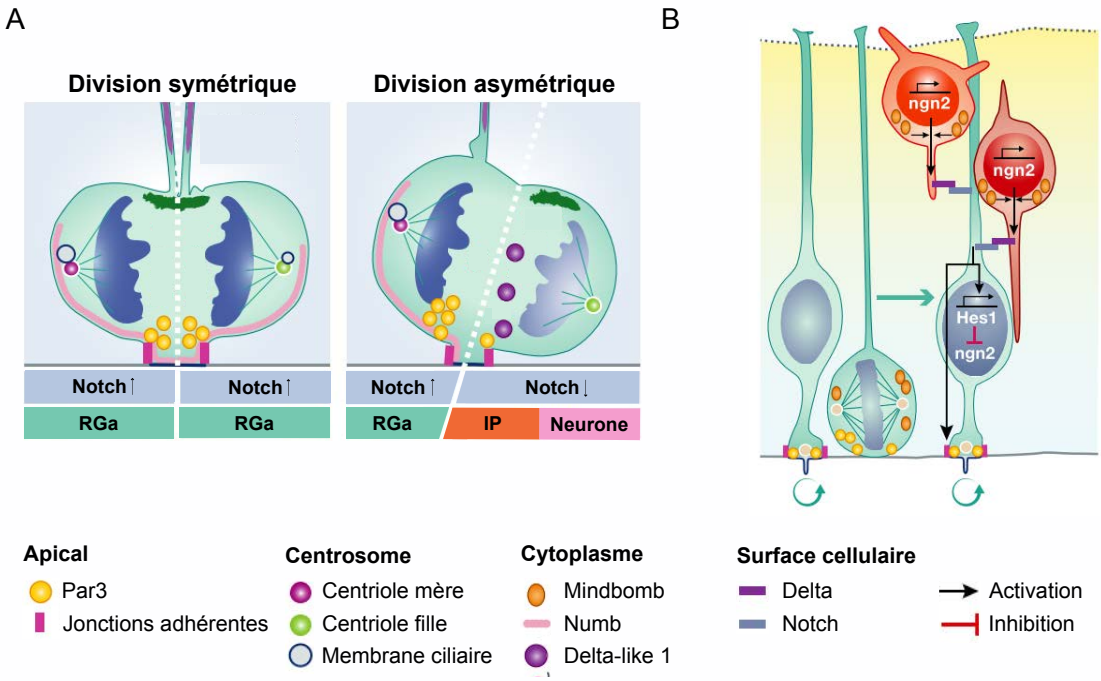


Figure 10. La voie de signalisation Notch. (A) Implication de la voie de signalisation Notch dans le destin cellulaire lors de la division symétrique et asymétrique. (B) Impact de la signalisation Notch sur les gènes pro-neuronaux. Les RGa (en vert) expriment Notch, ce qui va activer la transcription des gènes *Hes* et réprimer *Ngn2* un gène pro-neuronal. Au sein des progéniteurs intermédiaires (en rouge), l'absence de Notch entraine la transcription de *Ngn2* ce qui favorise la différenciation cellulaire. Abréviations : RGa : Cellules de la glie radiaire apicale, IP : progéniteurs intermédiaires. Adapté de *Paridaen & Huttner, 2014.*

2.2.2.2 La voie de signalisation Wnt

La voie de signalisation Wnt joue elle aussi un rôle dans la régulation de la prolifération et de la différenciation neuronale. Wnt est une molécule secrétée par la *roof plate* tout au long de l'axe apico-basal durant l'embryogenèse permettant l'orientation des parties postérieure et antérieure du tube neural (Yamaguchi, 2001). Durant la neurogenèse précoce, elle promeut la division symétrique des RGa et pendant la neurogenèse tardive, elle favorise la formation des IP et la différenciation neuronale (Paridaen & Huttner, 2014). La voie canonique Wnt, autrement définie par la voie de signalisation Wnt/β-caténine, permet de réguler l'auto-renouvellement des progéniteurs neuronaux (Bielen & Houart, 2014 ; F. Da Silva & Niehrs, 2023 ; Wrobel et al., 2007). Le facteur secrété Wnt se lie aux récepteurs Frizzled (FZD) et LRP5/6 des RGa ce qui inhibe GSK3 et stabilise la β-caténine. Cette dernière transloque dans le noyau, ce qui entraîne la transcription de *TCF/LEF* et favorise l'augmentation du pool de progéniteurs par division symétrique (Paridaen & Huttner, 2014 ; Wrobel et al., 2007 ; Figure 11). En revanche, le rôle de Wnt dans la différenciation ne fait pas encore consensus. Une étude chez la souris

montre que la Wnt/β-caténine à travers la régulation de N-myc, réprime Notch et agit sur les facteurs Ngn1/2 favorisant la différenciation neuronale (Kuwahara et al., 2010). Cependant, une autre hypothèse a été mise en avant, la voie Wnt/STOP (« Stabilization of proteins ») aurait un rôle dans la différenciation (Da Silva et al., 2021). Les effecteurs clés de cette voie sont la cycline Y et la cycline Y-like qui vont activer le récepteur LRP6. Durant la phase de mitose, LRP6 s'active engendrant un pic de la signalisation et inhibe GSK3. Ce dernier ne peut plus réprimer les facteurs pro-neuronaux Sox4 et Sox11 ce qui va favoriser la différenciation neuronale (Da Silva et al., 2021). Ainsi, la voie Wnt/β-caténine régulerait majoritairement l'auto-renouvellement des RGa mais pourrait également influencer la différenciation neuronale en régulant N-Myc (Wrobel et al., 2007). La voie Wnt/STOP favoriserait la division asymétrique et donc la différenciation neurale (Da Silva et al., 2021 ; Figure 11).

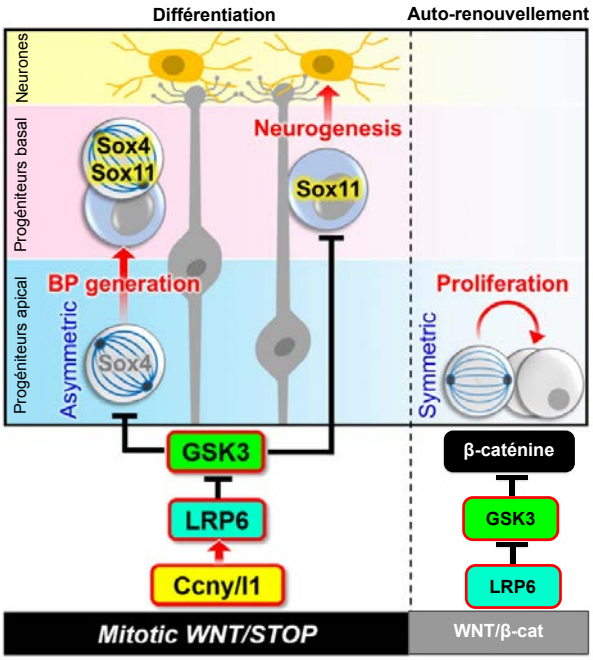


Figure 11. La voie de signalisation Wnt. Schématisation de la voie de signalisation Wnt/STOP (à gauche) favorisant la différenciation neuronale et Wnt/β-caténine (à droite) favorisant la prolifération neuronale. Adapté de *Da Silva et al., 2021.*

2.2.2.3 La voie de signalisation Sonic Hedgehog

La voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh) participe également à la régulation de la prolifération, en régulant la cinétique du cycle cellulaire des RGa, et de la différenciation en favorisant la production des IP (Komada et al., 2008 ; Shikata et al.,

2011). Cette voie de signalisation est composée d'un ligand secrété Shh et d'un récepteur *Patched* (Ptch) qui se trouve sur le cil primaire. Le cil primaire est une extension du cytoplasme qui est présente à la surface des cellules. C'est une structure composée de MT et il a la capacité de détecter les signaux environnants et moduler certaines voies de signalisation. Lorsque le ligand secrété Shh se lie au récepteur Ptch, le complexe sort du cil primaire des RGa. Cela entraîne l'accumulation de *Smoothened* (Smo), qui se lie à PKA et l'inactive entrainant la dissociation de Sufu et de *Gli activator* (GliA). Le complexe transloque dans le noyau et initie la transcription des gènes cibles (Cai et al., 2024 ; Paridaen & Huttner, 2014). Ainsi, Shh régule la durée du cycle cellulaire et sa cinétique, favorisant ainsi la prolifération des RGa dans la VZ/SVZ (Komada et al., 2008). Plus tard dans le développement, la présence de Shh diminue entraînant l'inhibition de Smo par Ptch. Cela conduit à l'inhibition de Gli par Sufu, et le complexe transloque dans le cil primaire. PKA phosphoryle Gli3R, qui ne peut alors initier la transcription des gènes cibles (Wang et al., 2011). Ainsi, lorsque la quantité de Shh est diminuée, cela favorise la génération et la maintenance des IP (Cai et al., 2024 ; Komada et al., 2008 ; Shikata et al., 2011 ; Figure 12).

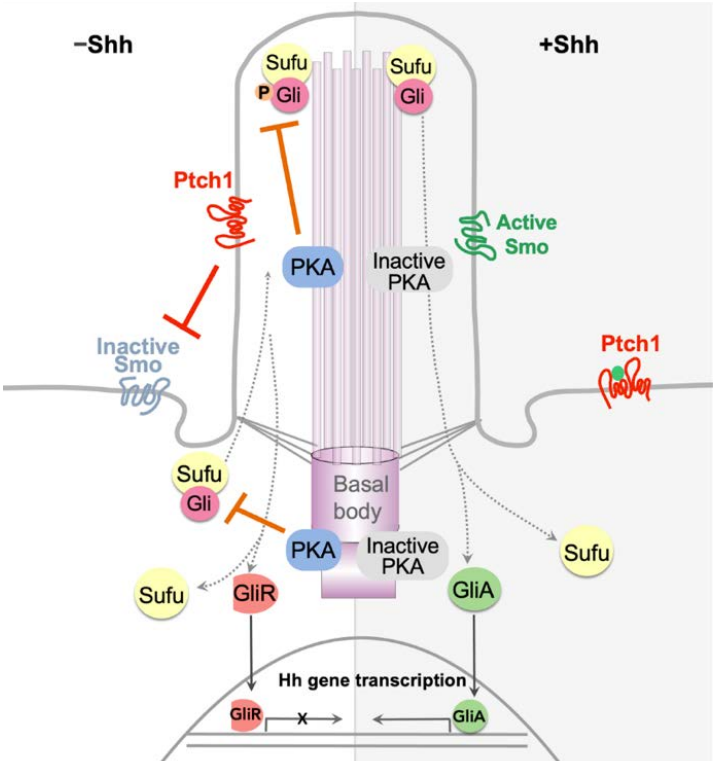


Figure 12. La voie de signalisation Shh. Schématisation de la voie de signalisation Shh en présence du ligand (à droite) et en absence du ligand (à gauche) pour médier la prolifération et la différenciation neuronale. Adapté de *Cai et al., 2024.*

2.2.2.4 Les profils d'expression moléculaire et transcriptomique

De nombreux mécanismes participent et influencent la destinée cellulaire. En revanche, la relation entre les profils moléculaires des neurones matures et ceux des cellules progénitrices dans la destinée cellulaire n'est pas clairement établie.

En effet, les neurones matures ont des profils d'expression moléculaire spécifiques, liés à leur position finale dans les couches corticales (Figure 13). La SP devient en post-natal la couche VIb et exprime les marqueurs Nurr1, Cplx3 et Crgf (Arimatsu et al., 2003 ; Chang et al., 2024 ; Wang et al., 2011). Par la suite, les neurones générés les plus précocement formeront les couches les plus profondes et exprimeront Tbr1 (couches VI), Foxp2 ; CTIP2 ; Fezf2 (couche V-VI) mais également Bcl11b (couche V). A l'inverse, les neurones des couches superficielles exprimeront des marqueurs tels que Rorβ (couche VI), Cux1 et Cux2 (couche II-IV) ou encore la Reelin (couche I) (Molyneaux et al., 2007 ; Woodworth et al., 2012). Ces données suggèrent que les facteurs de transcription jouent un rôle dans l'établissement de la destinée cellulaire.

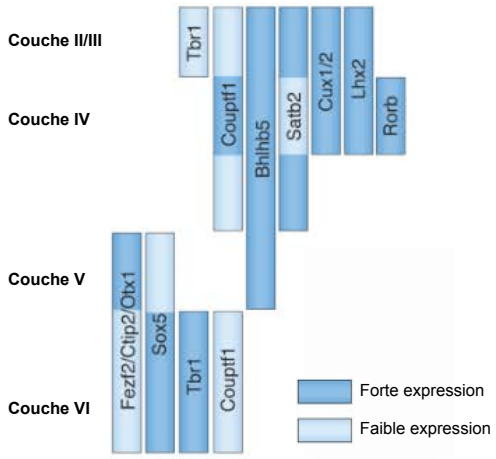


Figure 13. Les marqueurs de couches. Expression des différents marqueurs moléculaires en fonction des couches corticales. Adapté de *Woodworth et al., 2012.*

Les progéniteurs néocorticaux génèrent par vagues les différents sous-types de neurones corticaux. Le cortex est composé d'une très grande diversité de sous-types neuronaux mais la manière avec laquelle cette diversité apparait au cours du développement n'est pas totalement comprise. En effet, une controverse persiste quant à l'influence des lignées de progéniteurs menant à des sous-types neuronaux spécifiques. De plus, bien que les avancées récentes apportent de nombreuses pistes, les mécanismes

moléculaires qui déterminent l'ordre de génération des sous-types neuronaux demeurent méconnus. Trois grandes théories sont proposées et pourraient expliquer comment le destin cellulaire est établi au sein des progéniteurs (Figure 14).

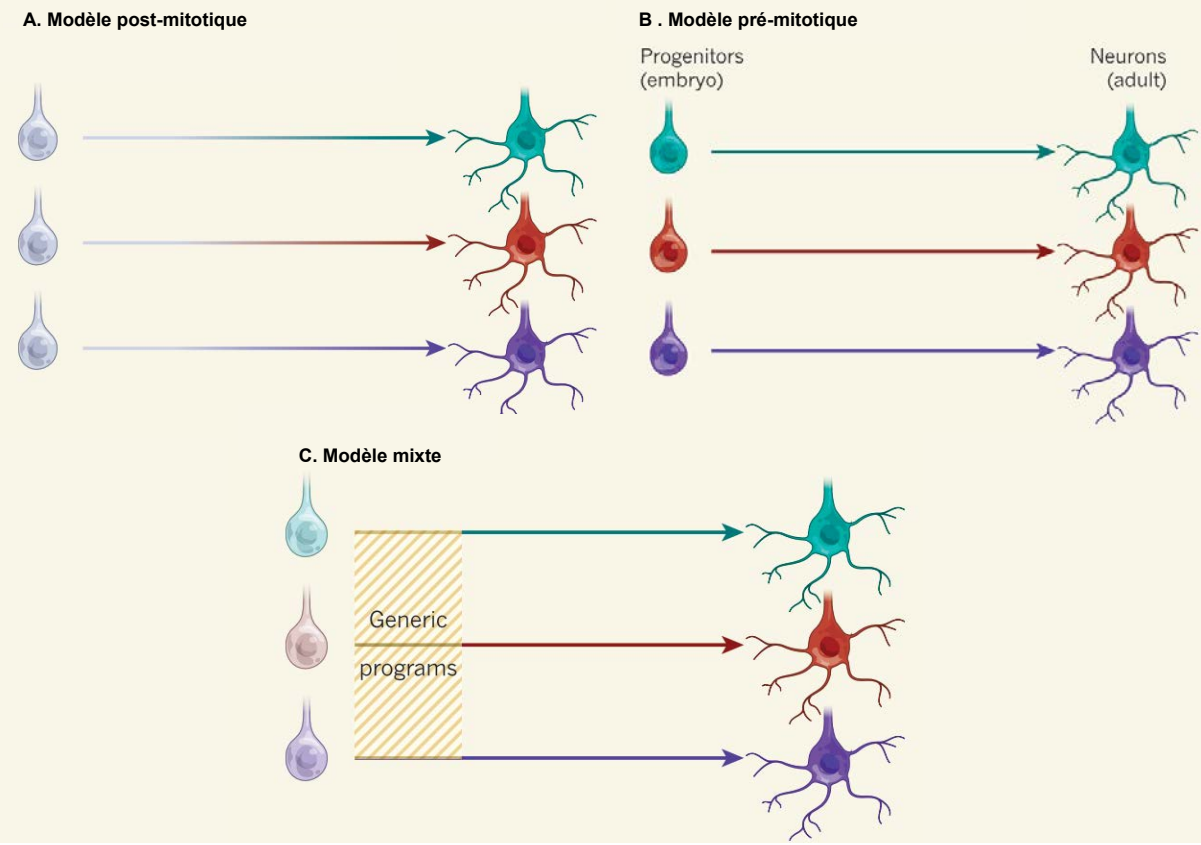


Figure 14. Modèles de l'émergence de la diversité neuronale. Adapté de *Telley & Jabaudon, 2018.*

1) La première théorie, le modèle post-mitotique, repose sur l'idée qu'une seule lignée de progéniteurs engendre par vagues séquentielles l'intégralité des sous-types de neurones. La spécification des progéniteurs neuronaux serait restreinte au cours du développement (Greig et al., 2013 ; Telley & Jabaudon, 2018 ; Figure 14). Ce modèle est soutenu par plusieurs études, qui mettent en avant que des progéniteurs issus de stades précoce sont plus multipotent et peuvent, lorsqu'ils sont transplantés à des stades plus tardif générer des neurones des couches superficielles (Desai & McConnell, 2000). En revanche, un progéniteur issu d'un stade plus tardif et implanté dans un stade précoce n'a pas cette capacité, il est limité à la production de neurones des couches supérieures (Desai & McConnell, 2000 ; Frantz & McConnell, 1996). Ces données indiquent que les progéniteurs précoces et tardifs diffèrent et n'ont pas le même potentiel de spécification.

2) Un modèle alternatif, le modèle pré-mitotique, propose que des lignées de progéniteurs indépendants et pluripotents, influencées par des facteurs de transcription spécifiques durant le développement, génèrent des sous-types neuronaux distincts destinés aux couches profondes ou superficielles en développement (Greig et al., 2018 ; Telley & Jabaudon, 2018 ; Figure 14). Ainsi, les programmes intrinsèques des cellules progénitrices détermineraient la destinée cellulaire. Le facteur de transcription LHX2, en modulant l'expression de gènes et de régulateurs épigénétiques, favorise la formation de la couche VI et l'établissement de la connectivité de ces couches (Chou & Tole, 2019). Le facteur de transcription FEZF2 est exprimé précocement dans certains progéniteurs de la VZ pendant la période de genèse des neurones des couches profondes (Greig et al., 2013). Il agit comme un répresseur transcriptionnel pour des gènes impliqués dans la spécification des neurones de la couche V et joue un rôle dans la différenciation des neurones de la couche VI (Tsyporin et al., 2021). En revanche, d'autres études ont montré que les RGa exprimant Fezf2 sont des progéniteurs multipotents produisant des neurones de toutes les couches corticales (Guo et al., 2013). De plus, le facteur de transcription Cux2 est exprimé dans les couches superficielles II-IV et également dans les IP, suggérant que le destin cellulaire des couches superficielles pourrait être déterminé avant la différenciation neuronale (Franco et al., 2012). Une sous-population de RGa exprime Cux2, indiquant leur propension à générer des neurones des couches superficielles. Cela suggère l'existence de deux classes de progéniteurs : l'une, Cux2-, produisant des neurones des couches profondes, et l'autre, Cux2+, générant des neurones des couches superficielles (Franco et al., 2012). Ce modèle reste cependant controversé et a été réfuté par diverses publications, montrant que, au contraire, les RGa exprimant Cux2 génèrent à la fois des neurones de projection des couches profondes et superficielles (Guo et al., 2013 ; Villalba et al., 2021).

3) Le dernier, nommée modèle mixte, est à mi-chemin des deux précédents modèles (Telley & Jabaudon, 2018 ; Figure 14). Il propose que les progéniteurs ont des propriétés assez similaires et présentent seulement de petites différences, comme dans le modèle post-mitotique. En revanche, ces différences pourraient être suffisantes pour favoriser la diversité neuronale, comme dans le modèle pré-mitotique. De récentes études transcriptomiques, menées chez le rongeur, sont en faveur de ce modèle (Nowakowski et al., 2017 ; Telley et al., 2019). En effet, Les progéniteurs apicaux (PA) ont une dynamique transcriptionnelle qui évolue au cours du développement. Ce changement entraîne des modifications au sein des PA durant les étapes précoces et tardives. Lors des étapes

précoces, les expressions dynamiques de gènes favorisent un mode dirigé en interne, aussi qualifié d'introverti, plus concentré sur des processus du cycle cellulaire (Figure 15). Lors des étapes tardives, les PA adoptent un mode plus extéroceptif, qualifié d'extraverti, augmentant leur sensibilité aux signaux environnementaux (Telley & al., 2019 ; Figure 15). De plus, les PA et les neurones de leur descendance partagent une identité moléculaire et transcriptomique qui évolue au cours du temps et sont soumis à des programmes de différenciation post-mitotique conservés tout au long de la corticogenèse (Figure 15). Ainsi, l'identité neuronale émerge des PA, cette identité repose sur des programmes de différenciation génétique et d'état transcriptionnel qui sont dépendants de l'âge (Telley & al., 2019).

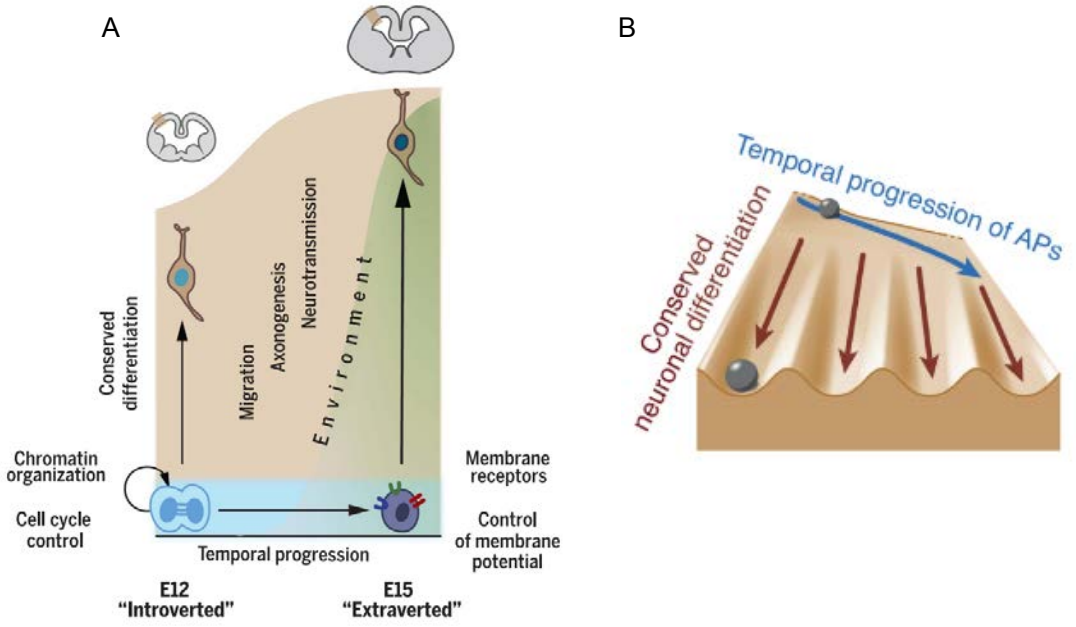


Figure 15. Organisation moléculaire temporelle dans le néocortex de la souris. (A) Schématisation de l'évolution de la dynamique transcriptionnelle des PA passant de « introverti » au début du développement à « extraverti » à des stades plus tardif. (B) Schématisation de la progression temporelle de l'identité des progéniteurs apicaux mais maintenant la conservation de la différenciation neuronale. Abréviations : APs : progéniteurs apicaux. Adapté de *Telley & Jabaudon, 2018.*

Selon ce modèle, la génération des neurones implique d'une part, sur un processus temporel par la génération de progéniteurs en vagues successives possédant un programme intrinsèque spécifique, et d'autre part, un contrôle par l'expression de facteurs extrinsèques.

2.3 Genèse des interneurones inhibiteurs

Mes travaux de thèse portant principalement sur l'étude des neurones excitateurs, je détaillerai de manière plus succincte les informations concernant les neurones inhibiteurs. Les neurones inhibiteurs du cortex, aussi nommés interneurones (IN), représentent environ 20 % des cellules composant le cortex cérébral. Ils se caractérisent par l'expression de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). Il existe une grande diversité d'IN définis selon leurs profils d'expression moléculaire, leurs morphologies, leurs propriétés électrophysiologiques et de leurs connectivités (Sultan & Shi, 2018 ; Welagen & Anderson, 2011). Les principaux IN (ici classés en fonction de l'expression de neuropeptides), qui représentent 60 % des IN corticaux, sont les IN à parvalbumine (PV), à somatostatine (SST), à calrétinine (CalR) et à protéine vasoactive intestinale (VIP) (Welagen & Anderson, 2011). Les IN corticaux sont générés dans le télencéphale ventral : dans les éminences ganglionnaires médianes (MGE) et caudales (CGE) ainsi que dans l'aire préoptique (APO) (Gelman et al., 2009 ; Sultan & Shi, 2018 ; Figure 16). Environ 90% des IN proviennent des MGE et des CGE et environ 10% proviennent de l'APO (D. Gelman et al., 2011). Les IN PV+ et SST+ proviennent majoritairement des MGE, tandis que les CalR et VIP sont issus de l'CGE (Molnár et al., 2019 ; Welagen & Anderson, 2011). Les premiers IN sont générés aux alentours de E11 chez la souris. Ils proviennent de progéniteurs qui ressemblent fortement aux RGa du pallium. Ce sont des cellules polarisées avec un pied apical et basal, capables de s'autorenouveler ou de se diviser de manière asymétrique pour produire un IN (Brown et al., 2011 ; Sultan & Shi, 2018). Comme pour les neurones glutamatergiques, leur diversité découle à la fois de leur origine spatiale et temporelle ainsi que de leurs propriétés intrinsèques. Les facteurs de transcription permettent donc de contrôler la différenciation et la spécification des IN. Entre autres, NKX2-1, LHX6 et Dlx sont des acteurs clés dans la différenciation des IN en favorisant leur destin cellulaire final (Sultan & Shi, 2018).

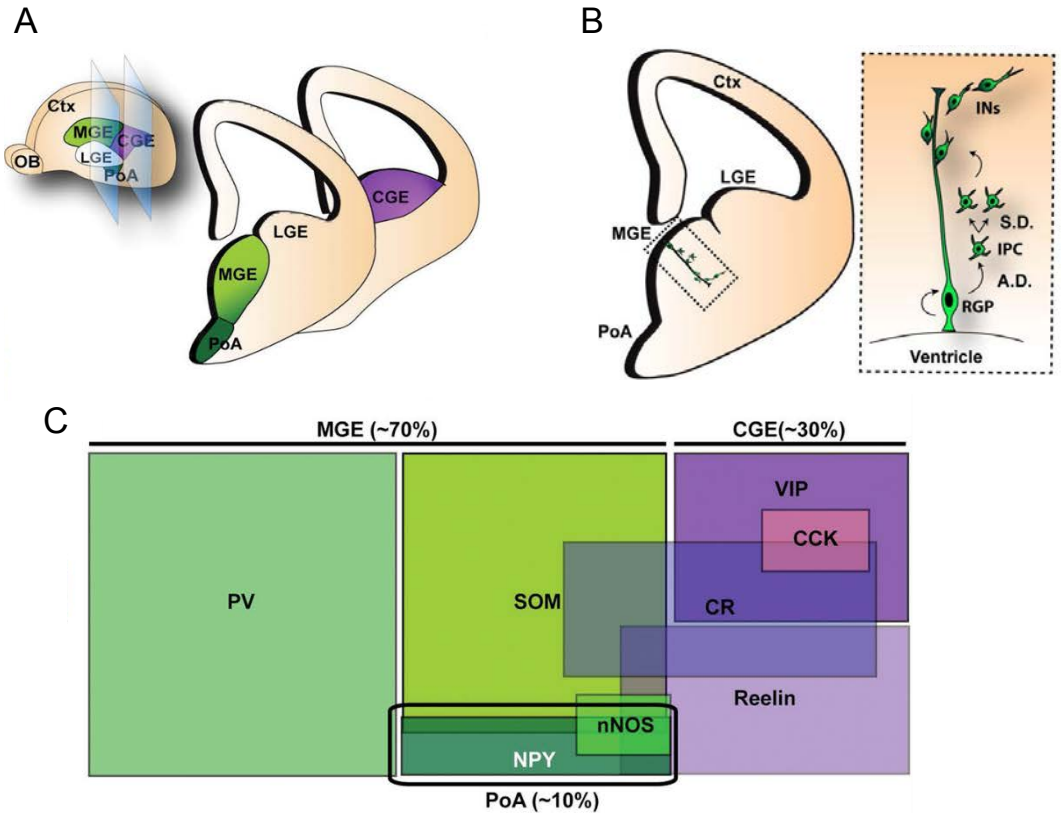


Figure 16. Zone de genèse et diversité des interneurones. (A) Schématisation des différentes zones de genèse des interneurones corticaux. (B) Schématisation de la génération des interneurones corticaux dans les MGE. (C) Associations des différentes zones de genèse avec les différents sous-types d'interneurones existants. Abréviations : OB : bulbe olfactif, Ctx : cortex, MGE : éminences ganglionnaires médianes, CGE : éminences ganglionnaires caudales, LGE : éminences ganglionnaires latérales, PoA : l'aire pré-optique, RGP : progéniteurs radiaux apicaux, A.D : division asymétrique, IPC : progéniteurs intermédaires, S.D : division symmétrique, INs : interneurones, PV : parvalbumin, SOM : somatostatine, NPY : neuropeptide Y, nNos : oxyde nitrique synthase neuronale, CR : calrétinine, VIP : protéine vasoactive intestinale, CCK : cholécystokinine. Adapté de *Sultan & Shi, 2018.*

Une fois les neurones excitateurs et les IN générés, ils entament leur migration afin d'atteindre leur destination finale au sein du cortex.

3. Migration

3.1. Migration des neurones glutamatergiques

Dès que les premiers neurones sont générés, la migration radiale se met en place par vagues successives, permettant aux neurones de migrer de la VZ en direction de la CP (Rakic, 1972). Les neurones vont d'abord former les couches corticales les plus profondes,

puis les couches superficielles en s'empilant les uns sur les autres selon un processus dit « Inside-out » (Figure 17).

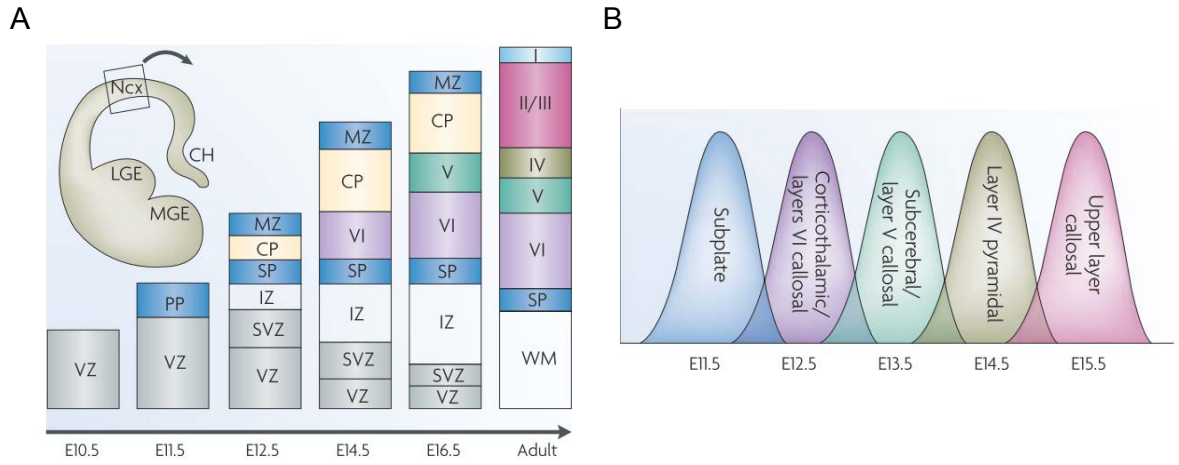


Figure 17. Migration neuronale "inside-out". (A) Schématisation de l'expansion de la CP au fur et à mesure que les neurones générés migrent. Les neurones nés plus tardivement s'empilent sur ceux née plus précocement, de sorte que les couches corticales se forment selon un processus « inside-out ». (B) Schématisation des vagues temporelles successives de neurogenèse permettant de générer les différentes classes de neurones. Abréviations : Ntx : néocortex, MGE : éminences ganglionnaire médiane, LGE : éminences ganglionnaires latérale, CH : hème cortical, VZ : Zone ventriculaire, PP : pré-plaque, SVZ : zone sous ventriculaire, IZ : zone intermédiaire, SP : sous plaque, CP : plaque corticale, MZ : zone marginale, WM : matière blanche. Adapté de *Molyneaux et al., 2007.*

La migration radiale se déroule en quatre étapes qui permettent aux neurones en migration d'atteindre la CP (Figure 18). La migration est un processus régulé par de nombreux facteurs sécrétés ainsi que par un ensemble de protéines, tels que des molécules d'adhérence cellulaire ou des protéines de liaison à l'actine. Ces différents acteurs permettent ainsi aux neurones en migration de maintenir leur polarité et leur morphologie dans le but d'atteindre leur positionnement final au sein de la CP (Kon et al., 2017).

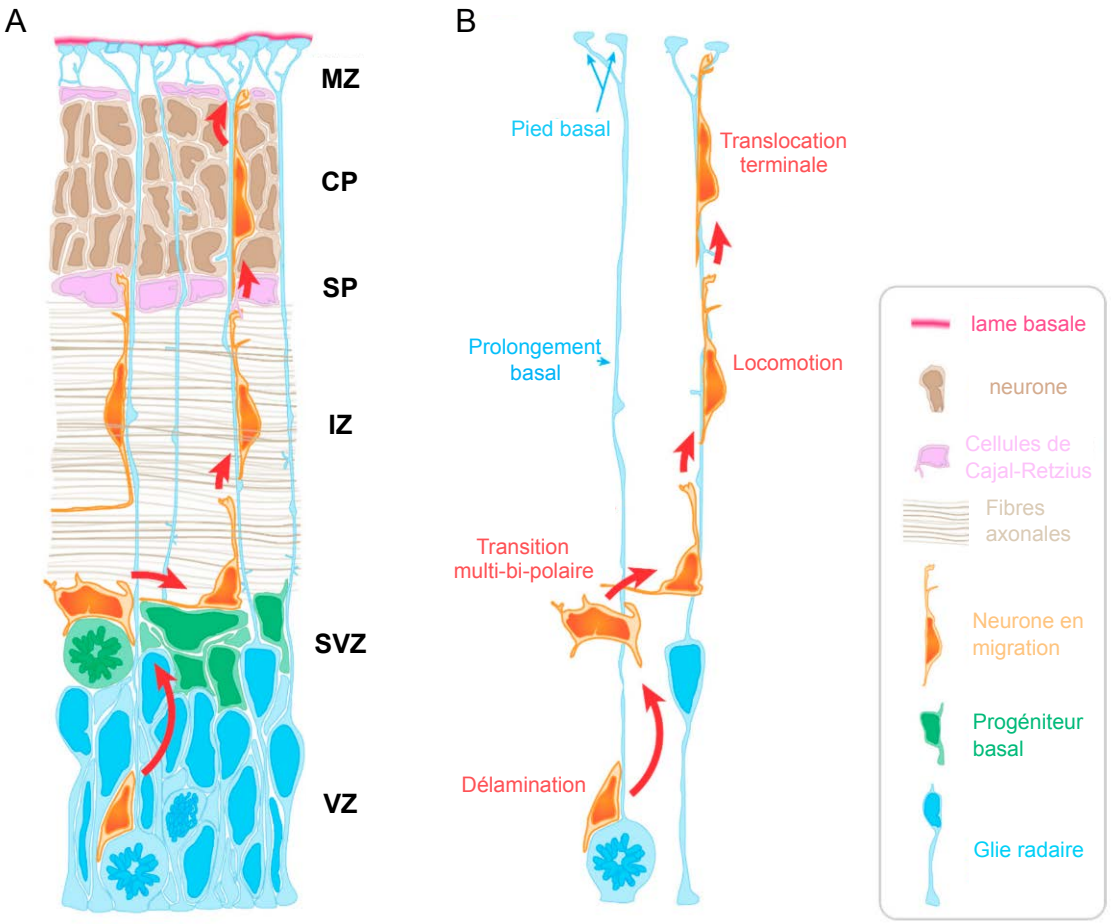


Figure 18. Les différentes étapes de la migration des neurones glutamatergiques. (A) Représentation schématique de la migration neuronale s'échafaudant le long des RGa à travers le néocortex. (B) Schématisation des quatre étapes majeures de la migration : la délamination du neurone de la glie radiaire, la transition multi-bipolaire, locomotion du neurone le long du pied basal de la glie radiaires et translocation terminale. Abréviations : VZ : zone ventriculaire, SVZ : zone sous ventriculaire, IZ : zone intermédiaire, SP : sous-plaque, CP : plaque corticale, MZ : zone marginale Adapté de *Meyerink et al., 2020.*

3.1.1 La translocation somatique

Durant les étapes les plus précoces de la neurogenèse, les neurones issus de la division des RGa héritent d'un pied basal solidement ancré (Miyata et al., 2001). Afin de migrer radialement, ils réalisent une translocation somatique, c'est-à-dire que le soma migre en direction de la CP jusqu'à atteindre sa position finale, tandis que le pied basal se rétracte (Miyata et al., 2001 ; Nadarajah et al., 2001). Ce mode de migration est beaucoup plus rapide que la locomotion, mais il est employé seulement précocement par une minorité de neurones.

3.1.2 La délamination

Aux alentours de E14 chez la souris, les neurones générés vont former les couches corticales les plus superficielles. À ce moment-là, la CP est plus étendue. Les neurones adoptent alors un autre mode de migration, qui regroupe une série de quatre étapes migratoires afin atteindre leur destination finale (Figure 17). Tout d'abord, les neurones délaminent, c'est-à-dire qu'ils quittent la VZ et se retrouvent rapidement dans la SVZ, où ils présentent une morphologie bipolaire (Noctor et al., 2004). Cette étape est régulée par **Lzts1**. C'est une protéine associée aux MT qui régule positivement la délamination des neurones de la surface apicale en altérant l'organisation des AJ. Pour cela, Lzts1 module la dynamique cellulaire en inhibant les MT et en activant simultanément l'actomyosine, permettant au neurone de se détacher de la surface apicale (Kawaue et al., 2019).

3.1.3 La migration et la transition multi-bipolaire

Par la suite, les neurones s'arrêtent dans la SVZ pendant 24 heures et acquièrent une morphologie multipolaire transitoire (Noctor et al., 2004 ; Tabata & Nakajima, 2003). Lors de cette étape très dynamique, les neurones étendent et rétractent leurs prolongements dans toutes les directions. Le complexe protéique ENA/VASP, protéines régulatrices associées aux filaments d'actine (F-actine), participe à la motilité cellulaire et régule la morphologie des neurones multipolaires (Yoshinaga et al., 2012). En tandem avec Lpd, une protéine de remodelage de l'actine, le complexe régule positivement le nombre de prolongements primaires des cellules multipolaires dans la zone intermédiaire (IZ ; Yoshinaga et al., 2012). Ainsi, les mouvements dynamiques des neurones multipolaires reposent en partie sur le remodelage des F-actine qui les composent (Yoshinaga et al., 2012). Une certaine proportion de ces neurones avance en direction de la CP à une vitesse lente et certains de ces neurones peuvent également migrer tangentiellement (Tabata & Nakajima, 2003). Les **éphrines** et leurs récepteurs jouent un rôle majeur dans la régulation de la migration tangentielle des neurones multipolaires au sein de la IZ. En effet, l'**éphrine-A** contrôle la distribution latérale des neurones multipolaires en favorisant leur déplacement (Torii et al., 2009), tandis que l'**éphrine-B1** restreint leur migration tangentielle (Dimidschstein et al., 2013). Un autre acteur impliqué dans la phase multipolaire des neurones est le récepteur **Uuc5**. Il a récemment été mis en avant que la formation du complexe Unc5D-Gpc3 joue un rôle dans la migration radiale (Akkermans et al., 2022). **Gpc3** est fortement exprimé dans les

progéniteurs apicaux, tandis que UNC5D est exprimée dans SVZ et la IZ où se trouvent les neurones multipolaires en migration. La formation de ce complexe permet de stabiliser les intéractions entre les progéniteurs apicaux et les neurones en migration (Akkermans et al., 2022).

Par la suite, les neurones changent de morphologie et redeviennent bipolaires : c'est la transition multipolaire-bipolaire (TMB). Cette transition se produit à l'interface de la IZ et de la SP. Il a récemment été démontré que cette transition est facilitée par les nSP, les neurones multipolaires à leur contact réalisent leur TMB (Ohtaka-Maruyama et al., 2018). Par la suite, les neurones bipolaires entrent dans la CP. Le facteur de transcription **FoxG1** réprime l'expression de Unc5D. FoxG1 est exprimé dans la VZ/SVZ et dans la CP mais peu dans la IZ. Ainsi, Unc5D, dont l'expression est grandement augmentée durant la migration multipolaire des neurones dans la IZ, est réduite lorsque les neurones entrent dans la CP. Ainsi, Unc5D est requis pour la TMB et sa diminution est indispensable pour que les cellules changent de morphologie et entament leur migration radiale dans la CP (Cooper, 2014 ; Miyoshi & Fishell, 2012). De plus, des facteurs sécrétés peuvent également avoir un impact notable sur la migration des neurones. C'est le cas de la **Reelin**, sécrétée par les CR (voir 2.1.2 Les cellules de Cajal-Retzius). La Reelin peut se lier à deux récepteurs nommés « *very low density lipoprotein receptor* » (Vldlr) et « *Apolipoprotein E receptor 2* » (ApoER2) exprimé par les neurones multipolaires en migration. Cette liaison active **Rap1** qui à son tour, régule la N-cadhérine. Cette dernière est requise dans l'orientation de la migration des neurones multipolaires avant l'entrée dans la CP et régule également leur adhérence aux RGa (Jossin & Cooper, 2011).

3.1.4 La locomotion

Les neurones bipolaires migrent ensuite en se déplaçant le long des RGa qui leur servent de support (Nadarajah et al., 2001 ; Rakic, 1972). Cette dernière étape de migration est saltatoire et se découpe en phases séquentielles répétées jusqu'à atteindre la destination finale, un processus appelé locomotion. Tout d'abord, le neurone étend son prolongement de guidage en direction de la CP. Au sein de ce prolongement, une dilatation se forme dans la membrane plasmique et le centrosome migre à l'intérieur de celle-ci. Puis, le noyau et le soma s'allongent pour pénétrer dans la dilatation. Enfin, la région cytoplasmique postérieure se rétracte et le prolongement s'étend à nouveau (Kawauchi, 2015 ; Schaar & McConnell, 2005 ; Figure 19). La locomotion est soutenue par l'interaction

entre **Lis1** (PAFAH1b1), les dynéines et la myosine II. Ces protéines permettent le mouvement somatique, le mouvement nucléaire et la translocation nucléaire au sein d'un neurone durant la locomotion (Tsai et al., 2007). De plus, les molécules d'adhérences jouent également un rôle dans l'échafaudage des neurones le long des RGa. Connexine-43 (**Cx43)** et connexine-26 (**Cx26**) sont exprimées au contact des neurones en migration et des RGa. CX43 permet la stabilisation du prolongement de guidage en interagissant avec le cytosquelette d'actine, ce qui permet aux neurones de migrer dans la CP. Cx26, quant à elle, joue un rôle dans la translocation du noyau (Elias et al., 2007 ; Kon et al., 2017). Afin de maintenir l'orientation radiale et de guider les neurones, certains facteurs extracellulaires sécrétés jouent un rôle crucial. C'est le cas de la Semaphorine3A (**Sema3A**), dont l'expression est graduelle à travers la CP, et est plus fortement exprimée dans les couches superficielles (Chen et al., 2008). Ses récepteurs, neuropilin-1 et différentes plexines, sont exprimés dans les neurones en migration (Chen et al., 2008). Sema3A agit comme une molécule attractive qui permet aux neurones en migration d'être guidés de la IZ à leur position finale et de maintenir leur orientation radiale à travers la CP (Chen et al., 2008 ; Kon et al., 2017).

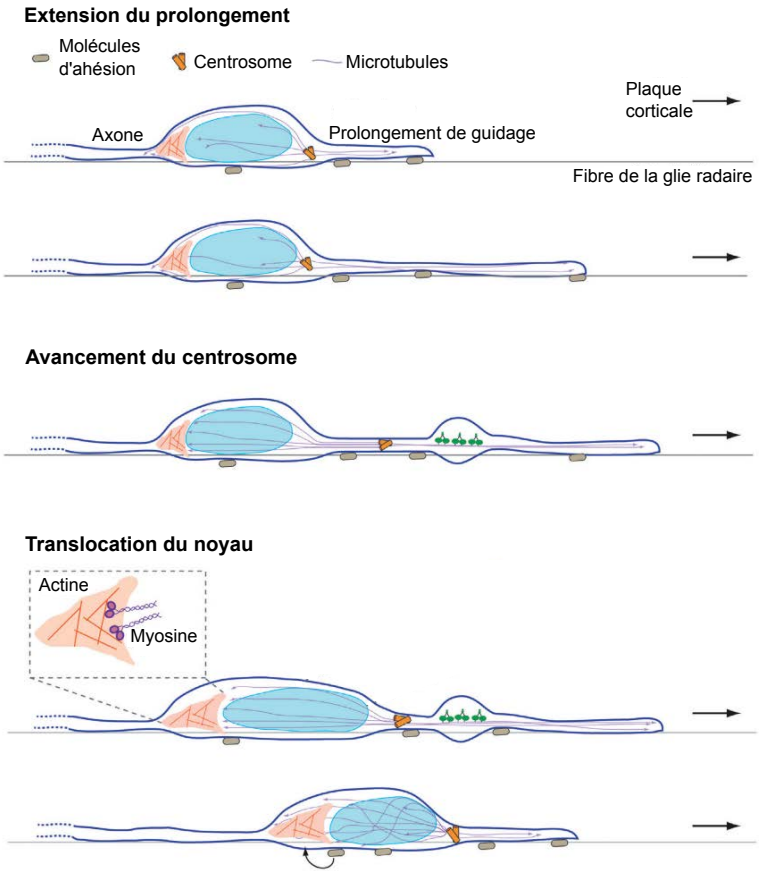


Figure 19. La locomotion. Schématisation des différentes étapes de la locomotion. Adapté de *Bertipaglia et al., 2018.*

3.1.5 La translocation terminale

Une fois arrivé près de la MZ, le neurone se détache de la RGa. Il s'ancre à l'aide de son prolongement de guidage dans la MZ et transloque son soma. Cette dernière étape se nomme la translocation terminale. Elle permet ainsi aux neurones d'être positionnés localement en fonction de leur naissance, ce qui permet la formation des différentes couches corticales selon le processus « inside-out » (Nadarajah et al., 2001 ; Sekine et al., 2011). Les neurones approchant le sommet de la CP font une pause avant d'entamer leur translocation terminale, suggérant que ce processus nécessite la mise en place de processus moléculaire. **Dab1**, phosphorylée par les récepteurs de la Reelin **ApoER2** et **Vldlr**, agit sur l'**intégrine α5β1** ce qui régule la translocation terminale dans la zone la plus externe de la CP (Sekine et al., 2011 ; Sekine et al., 2012).

3.2 Migration des interneurones inhibiteurs

En raison de leur zone de genèse spatialement plus éloignée, les IN adoptent un mode de migration différent pour s'intégrer dans le pallium : la migration tangentielle. Ainsi, une fois les IN post-mitotique générés, ils sont activement repoussés par des facteurs de répulsion dans la VZ et SVZ de la MGE. C'est à ce moment que la migration tangentielle débute (Toudji et al., 2023 ; Figure 20). Ils migrent alors en direction de la CP guidés par de nombreux facteurs de répulsion le long de leur trajectoire jusqu'à leur destination finale (Peyre et al., 2015 ; Toudji et al., 2023) Tout comme les neurones excitateurs, leur migration comprend trois phases, au cours desquelles la morphologie des IN change pour leur permettre de réaliser des mouvements saltatoires : (1) allongement et stabilisation de leur prolongement de guidage dans une direction, avec formation d'une dilatation contenant le centrosome, (2) translocation nucléaire au sein de la dilatation, (3) rétractation du prolongement postérieur (Bellion et al., 2005). Aux alentours de E12 chez la souris, les IN atteignent le cortex via deux voies de migration : une superficielle qui passe par la MZ, une autre plus profonde localisée dans la SVZ (Toudji et al., 2023). Entre E15 et E16, une troisième voie se met en place au sein de la SP (Peyre et al., 2015). La voie empruntée par les IN dépend à la fois de leur lieu et date de naissance, ainsi que leur identité cellulaire (Toudji et al., 2023). Une fois arrivés dans le pallium via ces différentes voies, les IN se dispersent au sein du cortex en changeant de mode de migration. Ils commencent à migrer radialement afin de se répartir au sein du cortex (Ang

et al., 2003 ; Polleux et al., 2002). Il est important de noter que, tout comme les neurones glutamatergiques, les IN sont sous le contrôle de nombreux signaux extracellulaires et de programmes cellulaires intrinsèques autonomes (Peyre et al., 2015 ; Toudji et al., 2023). C'est au cours de la première semaine de vie post-natale chez la souris que les IN arriveront dans leur couche corticale appropriée et stopperont leur migration (Bortone & Polleux, 2009).

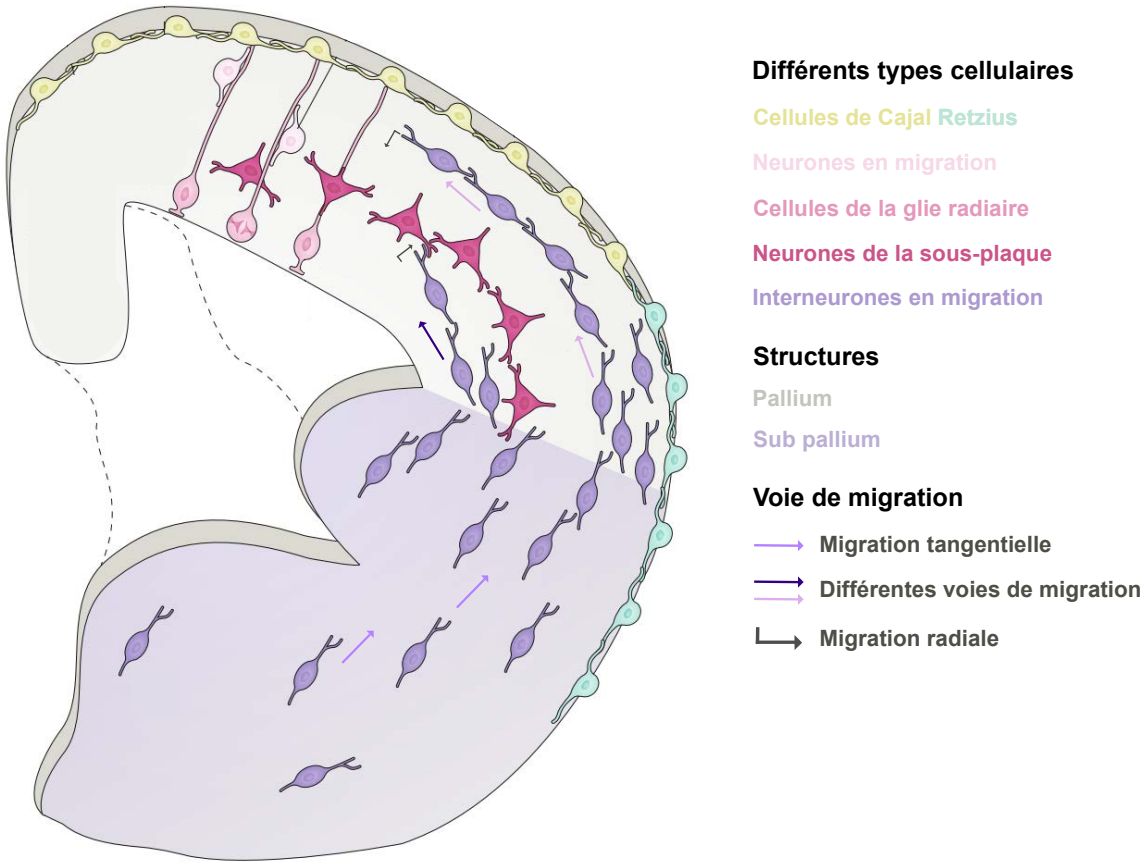


Figure 20. Migration tangentielle des interneurones. Schématisation des différentes voies de migration tangentielle des IN en provenance du subpallium radialement. Adapté de *Silva et al., 2019.*

Une fois que les neurones et interneurones atteignent leur destination finale, ils entrent dans la phase de maturation pour devenir fonctionnels, s'intégrer et former le réseau cortical.

4. Maturation des neurones glutamatergiques

Les neurones afin d'acquérir leur morphologie terminale, doivent passer par plusieurs processus conduisant à l'élongation de leur axone, la croissance de leurs dendrites et la mise en place des synapses. Les neurones post-mitotiques héritent de la polarité apico-basale des progéniteurs qui les génèrent. Les neurones maintiennent cette polarité lors qu'ils entament leur migration radiale et jusqu'à leur établissement dans le cortex (Polleux & Snider, 2010). Cette polarité permet l'émergence du compartiment axonal dans la partie apicale et du compartiment somato-dendritique dans la partie basale du neurone. Les neurones nouvellement générés étendent leurs axones et leurs neurites qui vont se différencier par la suite en dendrites (Auladell et al., 1995 ; Luo et al., 2016 ; Noctor et al., 2004 ; Schwartz et al., 1991). Dans cette partie, je développerai les différentes étapes de la maturation des neurones glutamatergiques permettant la formation d'un axone, d'un arbre dendritique et la formation de ces épines et des synapses matures.

4.1 Le prolongement axonal

4.1.1 L'axogenèse

La formation du prolongement axonal est l'étape initiale de la maturation neuronale. L'axone est une projection unique partant de la partie apicale du soma neuronal et qui permet la communication entre les neurones par propagation des potentiels d'action. Il se forme du côté opposé au prolongement de guidage des neurones en migration (Auladell et al., 1995 ; Noctor et al., 2004 ; Schwartz et al., 1991). Sa croissance débute précocement durant le développement embryonnaire. En effet, les neurones post-mitotiques commencent à développer leurs prolongements axonaux dès qu'ils se trouvent dans la IZ (Auladell et al., 1995 ; Lickiss et al., 2012 ; Schwartz et al., 1991) Cette croissance se poursuit tout du long de la locomotion puis durant les premières semaines post-natales (Figure 21).

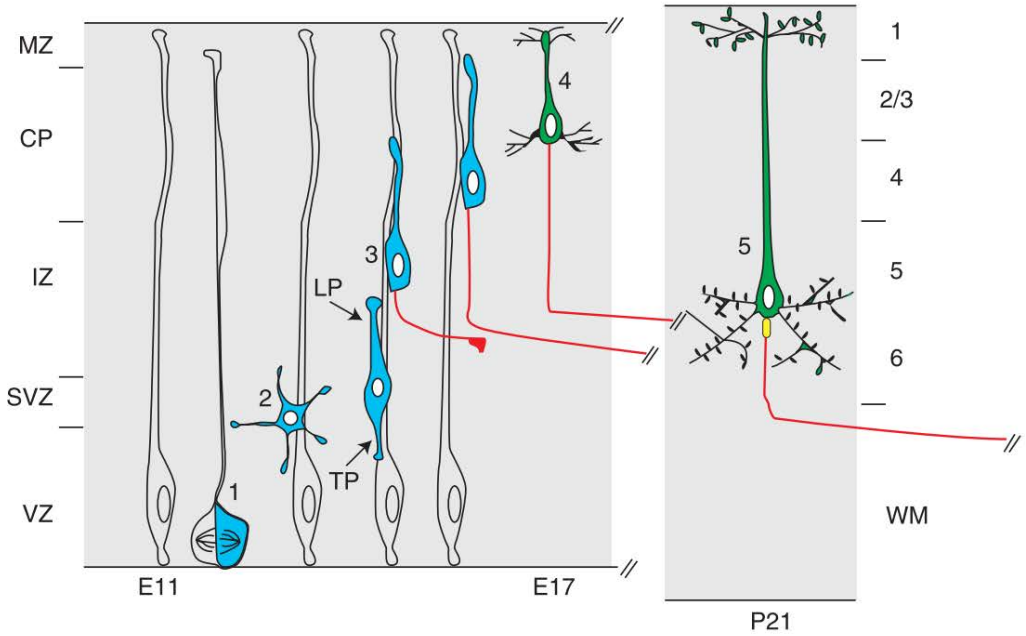


Figure 21. Le prolongement axonal. Schématisation de la croissance du prolongement axonal débutant durant l'embryogenèse jusqu'à son établissement final dans les premières semaines post-natale. La division cellulaire prend place dans la VZ (1) puis le neurone migre dans la SVZ et acquiert sa morphologie multipolaire (2). Lors que le neurone réalise sa TMB (TB) il commence à Abréviations : MZ : Zone marginale, CP : Plaque corticale, IZ : zone intermédiaires, SVZ : zone sous ventriculaire, VZ : zone ventriculaire, TP : transition bipolaire, LP : prolongement de guidage, W/M : matière blanche. Adapté de *Polleux & Snider, 2010.*

À l'extrémité du prolongement axonal se trouve une structure très motile nommée le cône de croissance (CC). Le CC est essentiel pour le guidage de la croissance axonale par sa capacité à détecter des signaux chimiques orientant le prolongement (Ye et al., 2019). La motilité et la croissance axonale sont régulées par le cytosquelette d'actine composé d'un réseau dense de F-actine et de MT (Franze, 2020). Les CC sont composés d'un domaine central à partir duquel s'étend un lamellipode plat, qui est constitué d'un réseau de F-actine court et ramifié, d'où émergent des protubérances nommées filopodes (Figure 22). Les filopodes sont constitués de faisceaux de F-actine capables de se rétracter. Les filopodes servent principalement à détecter les signaux environnementaux, tandis que les lamellipodes permettent au CC de se déplacer (Ye et al., 2019). Entre les deux, une région composée de structures contractiles de myosine régule l'actine et les MT (Ye et al., 2019). Ce sont les réseaux de F-actine dynamiques et les forces exercées au sein du CC qui permettent sa croissance (Blanchoin et al., 2014 ; Ye et al., 2019). En effet, la polymérisation de l'actine à la périphérie du CC génère des forces compressives qui poussent l'actine contre la membrane cellulaire. Simultanément, des forces contractiles générées par les moteurs de myosine au centre du CC tirent les F-actine vers l'intérieur.

Le couplage des F-actine avec l'environnement extracellulaire conduit à la transmission des forces internes vers l'extérieur. Cela engendre des forces de traction qui tirent la base du CC vers l'avant créant un espace où les MT peuvent se développer et favoriser la croissance axonale (Blanchoin et al., 2014 ; Franze, 2020). De plus, l'orientation de la croissance de l'axone vers sa destination finale repose également sur la capacité du CC à détecter les signaux extracellulaires de différentes molécules de guidage. Il existe des molécules de guidage chémoattractives telles que les nétrines et les éphrines et des molécules chémorépulsives telles que Slit/Robo et les sémaphorines qui permettent le guidage de l'axone à travers le cortex (Polleux & Snider, 2010 ; Ye et al., 2019).

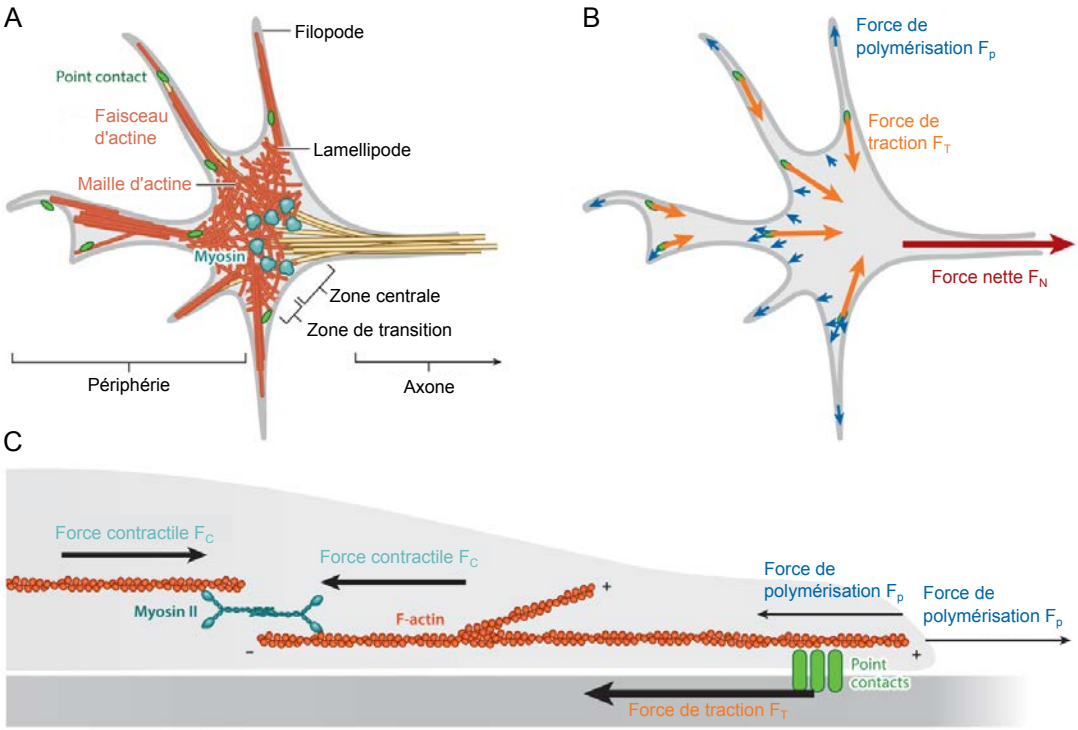


Figure 22. Le cône de croissance. (A) Représentation schématique du CC. (B-C) Schéma des forces exercées au sein du CC pendant son déplacement et sa croissance. Adapté de *Franze, 2020.*

4.1.2 Les projections axonales

L'axone permet la communication entre des neurones de zones spatialement différentes. Les neurones glutamatergiques, également nommés neurones de projection, présentent des projections axonales variées qui sont caractéristiques de leur position laminaire (Kwan et al., 2012). Les neurones de projection, sont principalement classés

selon leur territoire de projection : s'ils projettent au sein d'un hémisphère cortical (neurones de projection associative), à travers la ligne médiane vers l'hémisphère controlatéral (neurones de projection commissurale) ou vers une autre structure (neurones de projections corticofugale) (Greig, et al., 2013 ; Figure 23). Les neurones de projection associative se composent de neurones de projection intra-hémisphérique à courte et longue distance. La plupart des neurones de projection commissurale, appelés neurones callosaux (CPN), traversent la ligne médiane via le corps calleux. Ils sont principalement localisés dans les couches II/III, mais quelques-uns proviennent des couches V et VI. Ces neurones étendent leurs axones vers des emplacements en miroir dans la même zone fonctionnelle de l'hémisphère controlatéral (Greig et al., 2013 ; Woodworth et al., 2012). Enfin, les neurones de projections corticofugale comprennent les neurones de projection corticothalamique (CThPN) au sein de la couche VI et les neurones de projection subcérébrale (SCPN) au sein de la couche V, qui contactent le tronc cérébral et la moelle (Greig et al., 2013 ; Woodworth et al., 2012).

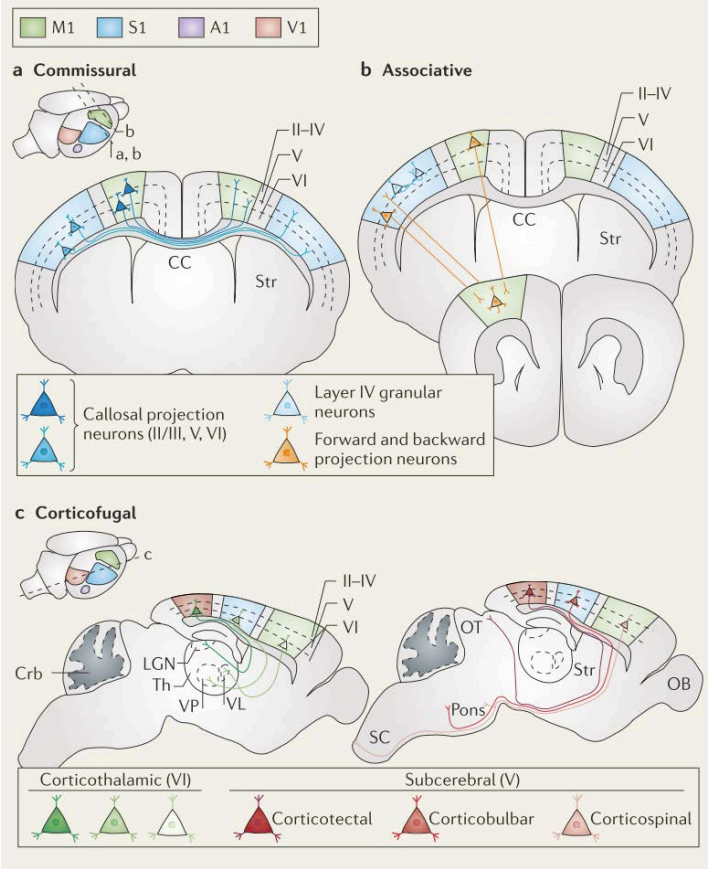


Figure 23. Diversité des neurones de projection. Représentation des différentes classes de neurones de projection : associative, commissurale et corticofugale. Abréviations : CC : corps calleux, Str : striatum, Crb : cervelet, LGN : corps géniculé latéral, Th : Thalamus, VP : noyau ventral postérieur, VL : noyau ventral latéral, SC : moelle épinière, OT : tectum optique, OB : bulbe olfactif. Issus de *Greig et al., 2013.*

4.2 La Dendritiogenèse

La dendritogenèse est le processus permettant l'établissement de l'arborisation dendritique d'un neurone. C'est à travers leur arborisation dendritique que les neurones reçoivent des entrées synaptiques d'autres neurones. L'architecture stéréotypée des différents sous-types neuronaux est essentielle à leur intégration dans les circuits neuronaux. Les neurones corticaux possèdent une arborisation dendritique basale et apicale. Ils reçoivent des signaux excitateurs au niveau de leurs dendrites basales et apicales proximales, tandis que leurs dendrites basales et apicales distales sont principalement soumises à des signaux inhibiteurs (Lanoue & Cooper, 2019). La formation de l'arbre dendritique est un processus régulé par des facteurs extrinsèques et intrinsèques (Lanoue & Cooper, 2019). La dendritogenèse commence à la fin de l'embryogenèse lorsque les neurones corticaux ont atteint leur emplacement définitif dans le cortex cérébral. Sa croissance se poursuit dans les premières semaines de vie post-natale.

La formation de l'arborisation dendritique est un processus dynamique qui implique le remodelage du cytosquelette d'actine. Cela permet l'extension, la rétractation, puis la stabilisation des ramifications dendritiques (Luo et al., 2016 ; Figure 20). Tout comme chez les lamellipodes, la formation de réseaux d'actine denses entraîne des forces internes contre la membrane plasmique, favorisant la protrusion et la motilité des neurites. Les actomyosines capturent et guident les extrémités des MT le long des F-actine, facilitant ainsi l'invasion des MT dans le processus dendritique en croissance (Lefebvre, 2021). Le contrôle temporel et spatial de la croissance des MT est crucial pour la formation des branches et la configuration de l'arborisation neuronale. Les microtubules sont dynamiques et leur comportement est modulé par des protéines associées aux microtubules (MAPs). Ces protéines régulent la stabilité des MT en contrôlant leur polymérisation et dépolymérisation, ce qui influence la croissance ou le rétrécissement des dendrites (Kapitein & Hoogenraad, 2015). La dynamique et l'organisation des F-actine ainsi que la formation des dendrites sont fortement régulées. En effet, le complexe Slit/Robo influence la croissance de l'arbre dendritique et son branchement (Whitford et al., 2002). ENA/VASP favorise l'élongation des F-actine, tandis que le complexe Arp2/3 favorise l'apparition de nouvelles branches (Kwiatkowski et al., 2007 ; Lefebvre, 2021 ; Stürner et al., 2019). De plus, de petites GTPases de la famille Rho, comme Cdc42 et Rac1, agissent sur Pak1 et Arp2/3 pour moduler l'établissement de

l'arbre dendritique. Rac1 et Cdc42 jouent un rôle crucial dans la stabilisation des branches dendritiques et régulent positivement la ramification des dendrites, tandis que RhoA semble limiter la longueur des dendrites (Lefebvre, 2021 ; Li et al., 2000 ; Nakayama et al., 2000 ; Newey et al., 2005 ; Stürner et al., 2019). La ramification des dendrites est également favorisée par l'activation de la cofiline, une protéine associée à l'actine qui régule la polymérisation de cette dernière, permettant ainsi l'extension des branches dendritiques (Lefebvre, 2021 ; Rosário et al., 2012). Les dendrites sont également orientées par des molécules de guidage, telles que la Sema3A, qui exerce un effet chémoattractif (Polleux et al., 2000). Le nombre conséquent de dendrites et leurs grandes ramifications augmentent la probabilité d'enchevêtrement et de croisements entre les branches dendritiques issues d'un même neurone. Pour organiser l'établissement d'un arbre dendritique correct, les neurones utilisent un processus appelé auto-évitement, grâce auquel les branches issues d'un même neurone se repoussent les unes des autres (Luo et al., 2016). Enfin, après l'extension, les branches dendritiques sont stabilisées par les MT, un processus qui recrute également les protéines MAPs (Luo et al., 2016). Une fois l'arbre dendritique établi, les épines se développent afin de pouvoir recevoir les entrées synaptiques des neurones afférents.

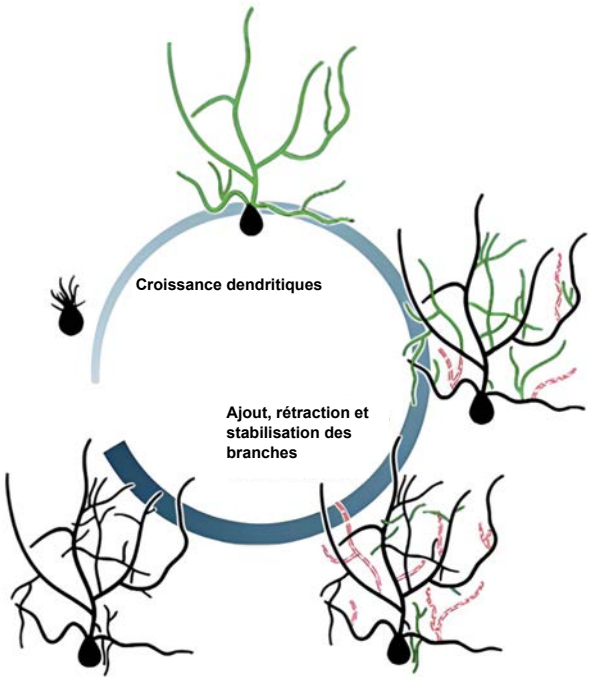


Figure 24. La dendritogenèse. Représentation schématique de la trajectoire développementale de l'arborescence dendritique. Dans un premier temps, les branches s'étendent (vert), puis certaines sont éliminées (rouge). Enfin, l'arbre dendritiques se stabilise (noir) afin d'acquérir sa morphologie terminale. Adapté de *Lefebvre, 2021.*

4.3 La Spinogenèse

Les épines dendritiques sont des renflements localisés sur la membrane de l'arbre dendritiques. Elles sont le support de la communication neurale car elles possèdent à leur surface les synapses qui assurent la transmission d'information entre les neurones (voir partie 4.1.4. La synaptogenèse). La plupart des synapses excitatrices se forment entre les axones terminaux et les épines dendritiques qui représentent le compartiment post-synaptique (voir partie 4.1.4. La synaptogenèse). La spinogenèse débute par l'émergence, sur les branches dendritiques, de protrusions riches en actine appelées filopodes (Chidambaram et al., 2019 ; Ziv & Smith, 1996). Les filopodes possèdent une structure très motile pouvant s'étendre et se rétracter de manière transitoire pour former des contacts synaptiques avec les axones adjacents. L'émergence des filopodes à partir des dendrites est régulée par la myosine (Blanchoin et al., 2014 ; Chidambaram et al., 2019). Lors des contacts synaptiques, les filopodes se transforment en épines dendritiques avec des synapses fonctionnelles (Chidambaram et al., 2019). Les épines sont généralement classifiées en fonction de leur morphologie à savoir : (1) les épines fines, qui sont peu stables, avec une petite tête et un petit cou ; (2) les épines dites « stubby », caractérisées par de grosses têtes et un petit cou ; (3) les épines champignons, qui sont très stables et qui présentent un cou et une tête large ; (4) les épines branchées ou en forme de coupe, qui possèdent deux têtes attachées à un seul cou (Chidambaram et al., 2019; Peters & Kaiserman-Abramof, 1970 ; Figure 25). Chacune de ces morphologies est associée à une durée de vie spécifique et reflète un degré variable de maturité, allant de formes immatures (1) vers des morphologies plus matures (3-4). Il est important de souligner que la forme branchée est très rare. De ce fait, les épines champignons sont des épines fonctionnelles et matures, qui sont connectées à un bouton axonal et qui ont une durée de vie prolongée (Grutzendler et al., 2002 ; Runge et al., 2020 ; Tønnesen et al., 2014). Les épines dendritiques contiennent une grande quantité d'actine. La structure des F-actine varie, allant de réseaux de filaments ramifiés à de robustes faisceaux de filaments réticulés, fournissant soutien et stabilité aux dendrites (Blanchoin et al., 2014 ; Chidambaram et al., 2019). C'est principalement la polymérisation et la dépolymérisation des F-actine ainsi que des myosines composant le cytosquelette qui déterminent la motilité, la croissance et la morphologie des épines dendritiques au cours du processus de maturation (Blanchoin et al., 2014 ; Chidambaram et al., 2019 ; Matus, 2005). Tout comme dans l'établissement de l'arbre dendritique, les petites GTPases de la famille de

Rho, tel que RhoA, Rac1 et Cdc42, jouent un rôle clé dans la régulation du cytosquelette d'actine et influencent la morphogenèse des épines (Newey et al., 2005). En particulier, Rac1 joue un rôle dans le maintien de la densité des épines dendritiques dans les neurones matures (Nakayama et al., 2000).

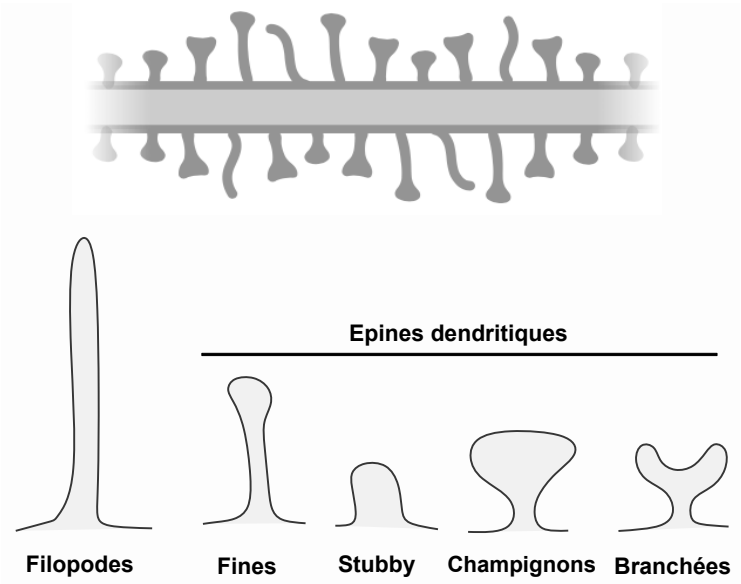


Figure 25. Les épines dendritiques. Schématisation des différentes morphologies des épines dendritiques, classées selon leur degré de maturation, allant des formes les moins mature (épines fines) aux formes plus matures (épines champignons).

4.4 La synaptogenèse

Les synapses sont essentielles pour établir la communication entre les neurones et ainsi former un réseau connecté. Les synapses permettent non seulement le transfert d'information d'un neurone à un autre, mais également le traitement de cette information (Südhof, 2021). Il existe deux types de synapses dans le système nerveux central : les synapses électriques et les synapses chimiques (Figure 26). Les synapses électriques sont constituées de jonctions Gap, qui sont composées de deux connexines formant des canaux intracellulaires qui permettent une connexion directe entre l'intérieur de deux cellules adjacentes. Cela leur permet de diffuser des ions de manière bidirectionnelle, facilitant une activité simultanée des cellules (Bennett & Zukin, 2004 ; Pereda, 2014). Cependant, la majorité des synapses chez l'adulte sont des synapses chimiques, composées de trois parties : un bouton terminal pré-synaptique, une fente synaptique et un compartiment post-synaptique (Qi et al., 2022). Les compartiments post- et pré-synaptiques contiennent tous deux des structures appelées respectivement « cytomatrice » et « densité post-

synaptique » (Qi et al., 2022). Ces structures sont composées de protéines d'échafaudage, connectées entre elles par des protéines d'adhérence cellulaire ancrées au cytosquelette (Qi et al., 2022). Les synapses chimiques transforment le signal électrique en signal chimique puis à nouveau en signal électrique. Lorsqu'un potentiel d'action se propage au sein du compartiment pré-synaptique, il entraine l'entrée d'ions calcium par des canaux voltage-dépendants au sein de la synapse. Ces ions calcium, par le bais d'intéractions protéiques, facilitent la translocation des vésicules contenant des neurotransmetteurs vers la membrane synaptique. Les vésicules s'ancrent alors à la membrane plasmique. Ensuite, la membrane de la vésicule fusionne avec celle de la synapse, permettant ainsi l'exocytose. Les protéines responsables de cette fusion sont les protéines SNARE, Snap-25 et Munc18 (Südhof, 2012 ; Südhof & Rothman, 2009). Certaines synapses sont excitatrices – glutamatergiques – et libèrent des neurotransmetteurs qui favorisent la dépolarisation du neurone post-synaptique tels que le glutamate ce qui augmente la probabilité de la générer un potentiel d'action. Les synapses inhibitrices - GABAergiques - sécrètent des neurotransmetteurs tels que le GABA qui entraînent l'hyperpolarisation du neurone postsynaptique. Les neurotransmetteurs, tels que le glutamate et le GABA, sont relâchés dans la fente synaptique. Ils se fixent ensuite sur des récepteurs adressés à la membrane post-synaptique. Parmi ces récepteurs, on trouve les récepteurs tétramériques AMPA, NMDA, les récepteurs pentamériques GABA (Südhof, 2021). Ces récepteurs sont ancrés à la surface membranaire par de nombreuses protéines d'échafaudage dont notamment la protéine PSD-95, particulièrement dans les synapses excitatrices. PSD-95 permet le couplage des différents récepteurs et ainsi de contrôler l'excitabilité des synapses (Qi et al., 2022). Lorsque le neurotransmetteur se fixe à son récepteur, le signal chimique est converti en signal électrique, permettant la transmission de l'information. Ce processus de conversion peut entraîner un délai de transmission du signal plus long par rapport à une synapse électrique. Les compartiments présynaptiques sont principalement situés au niveau des terminaisons axonales, mais ils peuvent également se trouver sur les dendrites. Les compartiments post-synaptiques se trouvent fréquemment sur les épines dendritiques (synapses excitatrices) ou les arbres dendritiques et le soma des neurones (synapses inhibitrices), mais ils peuvent également être formées sur les axones (Südhof, 2021). Une fois les connexions synaptiques établies cela permet la communication entre les neurones, au sein d'un réseau neuronal fonctionnel.

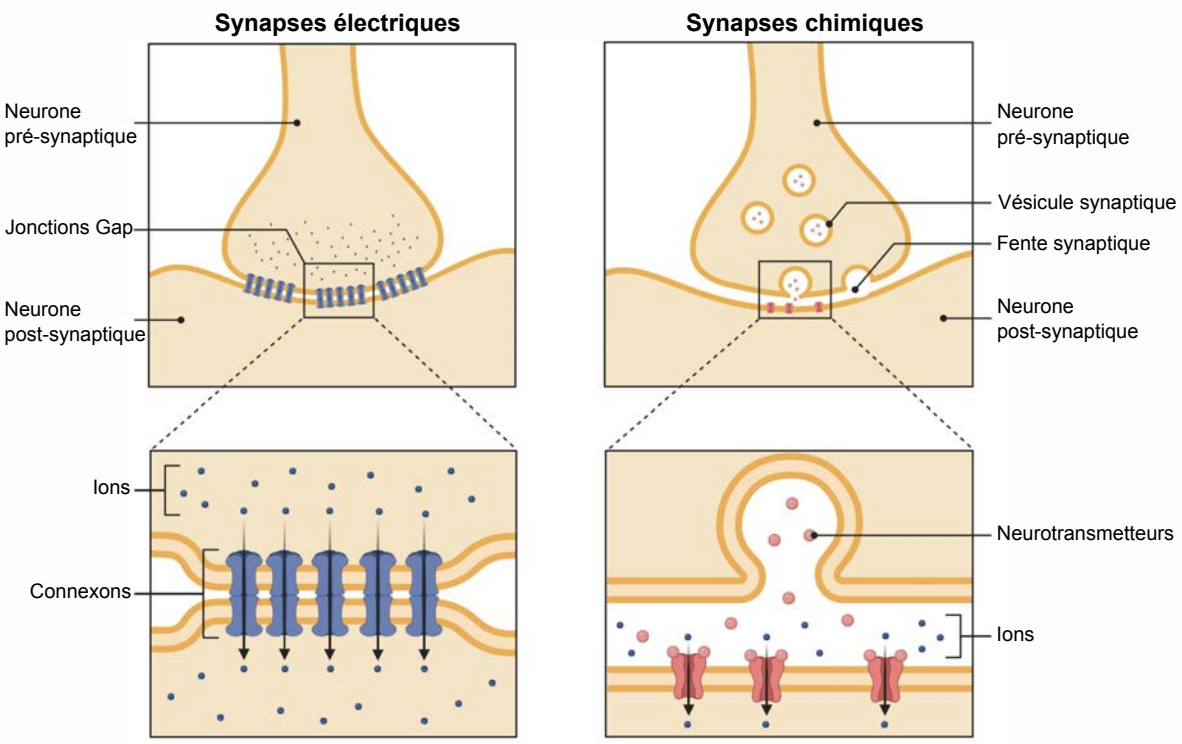


Figure 26. La synapse électrique et chimique. Schéma représentant les synapses électriques (à gauche) et chimiques (à droite).

Ainsi, le développement cortical repose sur une longue séquence embryonnaire et postnatale qui permet l'établissement du nombre approprié de neurones dans chaque couche corticale, ainsi que leur intégration dans le réseau (Figure 27). Ce processus repose sur des séquences temporelles et spatiales régulées tout au long de cette période.

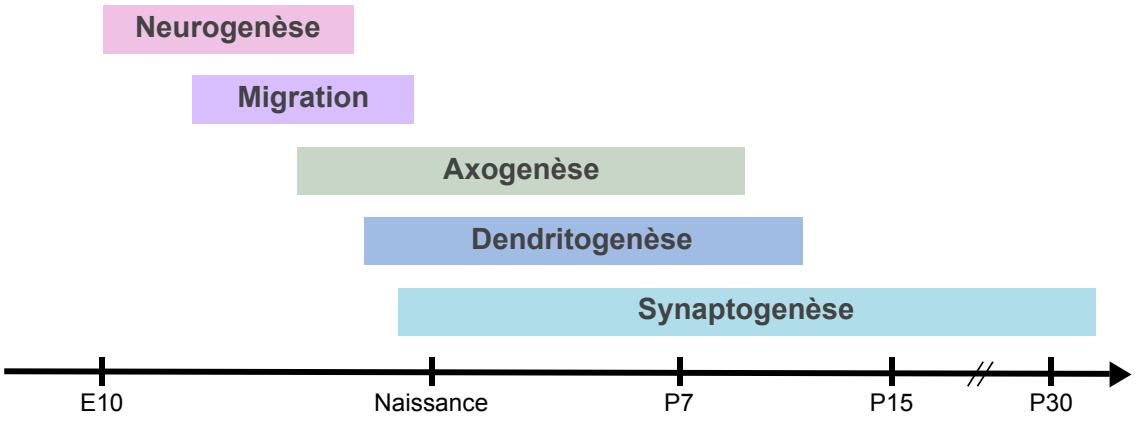


Figure 27. Le décours temporel des étapes de la corticogenèse.

Chapitre II : Les hétérotopies nodulaires périventriculaires

1. Les malformations du développement cortical

Des défauts de la prolifération, de la migration et de l'organisation neuronale sont à l'origine de nombreuses pathologies cérébrales communément appelées malformations du développement cortical (MCD). Sur le plan clinique, les MCD sont associées, dans la majorité des cas, à des épilepsies pharmaco-résistantes, du retard développemental, de la déficience intellectuelle, de l'autisme et des paralysies cérébrales (Parrini et al., 2016 ; Severino et al., 2020). Les causes des MCD sont variables et peuvent résulter de facteurs environnementaux, tels que des infections congénitales, de facteurs externes, tels que des événements vasculaires prénataux, ainsi que de causes génétiques (Rijckmans et al., 2024). Il existe différentes sous-classes anatomiques de MCD, elles sont très hétérogènes d'un patient à l'autre. Elles peuvent être focales ou diffuses, unilatérales ou bilatérales et associées à des altérations d'autres structures cérébrales tel que le corps calleux, les ganglions de la base, le tronc cérébral ou le cervelet. Le développement de l'imagerie par résonnance magnétique (IRM) a grandement amélioré le diagnostic des MCD. Cependant, elles sont rarement détectées avant la naissance, et tout diagnostic posée en prénatal nécessite une confirmation en post-natal (Rijckmans et al., 2024 ; Severino et al., 2020). Le diagnostic peut également être posé par un examen neurologique avec une attention particulière aux phénotypes, tels que les caractéristiques dysmorphiques, les signes d'atteintes du système nerveux périphérique, ainsi que par des tests génétiques et une neuroradiographie après la naissance (Rijckmans et al., 2024). Bien que de nombreux gènes aient été mis en relation avec les MCD, l'étiologie d'une grande proportion de cas cliniques reste encore non élucidée. Les MCD peuvent être classées en fonction de l'étape du développement la plus précoce supposément perturbé (Barkovich et al., 2012 ; Desikan & Barkovich, 2016 ; Severino et al., 2020). Ainsi, les MCD sont classées selon quatre groupes correspondant à : (I) des défauts de la prolifération neuronale et gliale ou de l'apoptose, (II) des défauts de la migration neuronale, (III) des anomalies post-migratoires, et (IV) les non classifiées (Barkovich et al., 2012 ; Desikan & Barkovich, 2016 ; Severino et al., 2020 ; Figure 28). Dans la suite de cette partie, je décrirai succinctement les principales MCD de type II résultant de la migration neuronale.

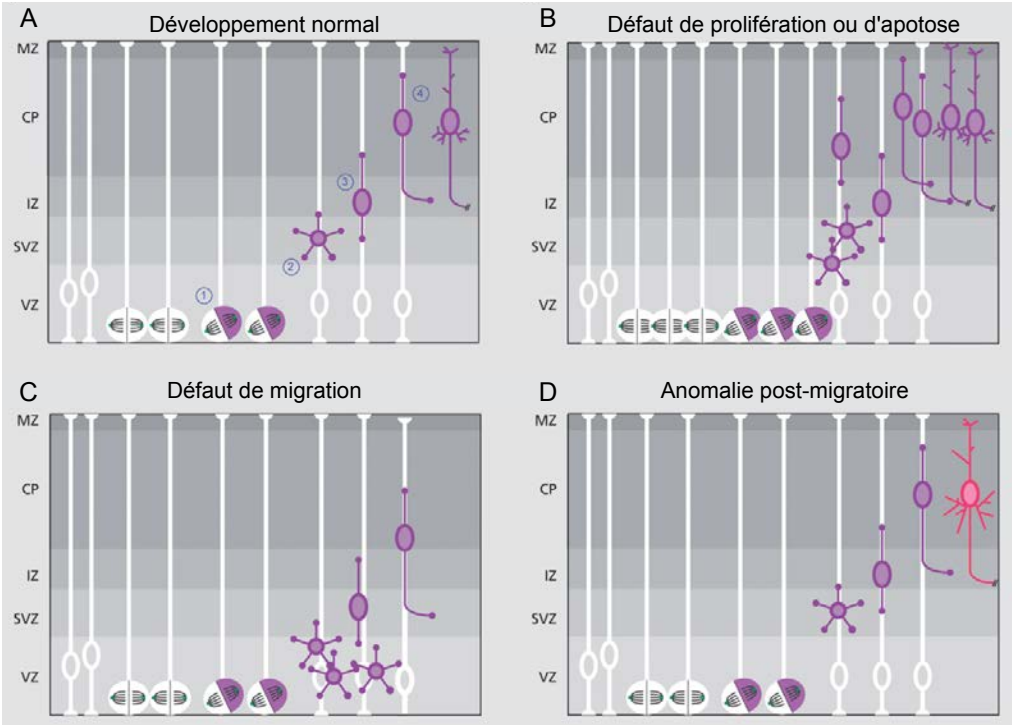


Figure 28. Classification des MCD. Représentation schématique de la classification des MCD selon l'étape du développement la plus précoce altérée. (A) Représentation du développement normal. (B) Altération de la prolifération ou de l'apoptose se traduisant par une augmentation (ici illustrée) ou une diminution du nombre de progéniteurs et de neurones post-mitotiques. (C) Défaut de migration neuronale pouvant entrainer la localisation ectopique des neurones post-mitotiques au sein du cortex ou une altération de la position au sein des couches corticales. (D) Anomalie post-migratoire pouvant entrainer des défauts de la maturation neuronale ou de la connectivité. Abréviations : VZ : zone ventriculaire, SVZ : zone sous ventriculaire, IZ : zone intermédiaire, CP : plaque corticale, MZ : zone marginale. Adapté de *Guarnieri et al., 2018.*

1.1 MCD type II : Défaut de la migration neuronale

Des altérations de migration entrainent la présence de neurones placés de manière ectopique au sein du cortex et sont également liées à des problèmes de repliement (« folding ») cortical. La **lissencéphalie de type I** (**LIS**) résulte d'un déficit de migration et se caractérise par l'absence (agyrie) ou la diminution (pachygrie) des circonvolutions, un épaississement cortical et une surface corticale lisse (Parrini et al., 2016 ; Severino et al., 2020 ; Figure 29). Elle résulte majoritairement de mutations somatiques ou germinales sur les gènes *LIS1* (PaFAH1B1) ou *DCX* (Doublecortine) chez les hommes (Caspi et al., 2000). Ces gènes codent des protéines qui interagissent avec la tubuline et les MT, permettant sa polymérisation et sa stabilité (Caspi et al., 2000 ; Fernández et al., 2016). Des mutations sur des gènes codant pour des sous-unités de tubuline (*TUBA1A, TUBB2B, TUBG1*) et des protéines moléculaires motrices (*KIF2A, KIF5C, DYNC1H1*) ont été mises en lien avec les **LIS** (Bizzotto & Francis, 2015 ; Guarnieri et al., 2018). La **LIS de type**

II ou **cobblestone,** se caractérise par une sur-migration neuronale par-delà la membrane piale (Figure 29). **LIS II** résulte principalement de mutations sur des gènes codant pour des glycotransférases tel que *POMT1, POMT2, FKTN, FKRP, LARGE* et *POMGnT1* (Bizzotto & Francis, 2015). Mais peut également résulter de mutations entraînant une perte de fonction du gène *GPR56*, qui code pour un récepteur d'adhérence couplé à une protéine G, se liant au collagène et pouvant activer RhoA (Guarnieri et al., 2018). Les **hétérotopies de la substance grise** se caractérisent par un regroupement de neurones ectopiques mal positionnés au sein de la substance grise ou en dessous de la substance blanche. Il en existe deux formes qu'on distingue par le positionnement des amas de neurones qui forme l'hétérotopie. Les **hétérotopies en bande sous corticale (SBH)** résultent d'un retard de migration et se caractérisent par la présence de couches bilatérales et symétriques de matière grise ectopique, interposées entre le cortex cérébral et les parois des ventricules latéraux (Matsumoto et al., 2001 ; Figure 29). Elles résultent majoritairement de mutations des gènes *LIS1* et *DCX* (Matsumoto et al., 2001). Le gène *DCX* étant porté par le chromosome X, les femmes porteuses de mutations hétérozygotes présentent des **SBH** tandis que les hommes présentent des **LIS**. En revanche, quelques cas de **SBH** chez des hommes porteurs de mutations faux sens sur *DCX* et de **LIS** chez des femmes ont été signalés (Matsumoto et al., 2001 ; Pilz et al., 1999). De plus, des mutations sur le gène *EML1* ont également été mises en lien avec des patients présentant des SBH en ruban (Kielar et al., 2014). Ce gène code pour une protéine associée aux MT, qui régule leur dynamique et leur polymérisation, ainsi que l'orientation du fuseau mitotique (Bizzotto et al., 2017). Les **hétérotopies nodulaires périventriculaires** (PVNH), également qualifiées d'hétérotopies sous épendymaires représentent le sous type d'hétérotopies de la substance blanche le plus commun. Une description détaillée de cette pathologie est développée dans la partie suivante.

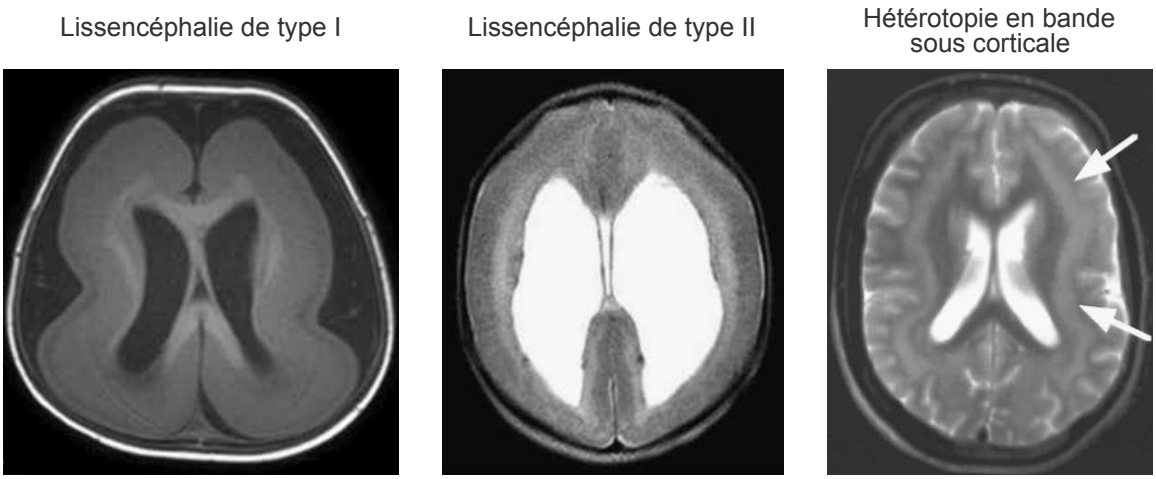


Figure 29. Les MCD de type II. De gauche à droite : IRM d'un cerveau atteint de lissencéphalie de type I, de lissencéphalie de type II et d'hétérotopie en bande sous-corticale (flèches blanches). Adapté, dans l'ordre, de *Rijckmans et al., 2024 ;* Lerman-Sagie & Leibovitz, 2016 *et Matsumoto et al., 2001.*

2. Les hétérotopies nodulaires périventriculaires

2.1 Le tableau clinique

Les PVNH représentent la forme la plus fréquente de MCD retrouvée à l'âge adulte. Les PVNH se caractérisent par la présence de nodules ectopiques sous-épendymaires de matière grise le long des ventricules latéraux, dont le nombre et la taille varient d'un patient à l'autre (Figure 30). Les PVNH résultent d'altérations des RGa qui séparent la paroi épendymaire du ventricule, les neurones post-mitotiques se retrouvent incapables de migrer hors de la VZ, où ils s'agrègent en nodules. À l'IRM certains patients présentent également des microcéphalies congénitales sévères, des polymicrogyries, des hypoplasies hippocampiques et cérébelleuses, ou des hydrocéphalies (Parrini et al., 2016 ; Pisano et al., 2012 ; Sheen et al., 2001). Sur le plan clinique, les PVNH sont associées à de l'épilepsie focale dont la sévérité est variable, à des atteintes cognitives variables, à des troubles du spectre autistique (TSA) et à des dysmorphies faciales (Parrini et al., 2016 ; Pisano et al., 2012). Il est estimé que 72% des patients atteints de PVNH présentent une épilepsie focale, mais celle-ci peut également être généralisée (Battaglia et al., 1997 ; Parrini et al., 2006). Les crises surviennent le plus souvent pendant l'enfance, mais l'âge d'apparition des crises varie de la période néonatale jusqu'à l'âge adulte (Parrini et al., 2006). La sévérité des crises peut varier de légères, avec de rares épisodes et une rémission spontanée sans besoin de médicaments antiépileptiques, à des cas l'épilepsie pharmaco-

résistante (Battaglia et al., 2006 ; Dubeau et al., 1995 ; Parrini et al., 2016). Les épilepsies pharmaco-résistantes seraient en plus grande proportion présentes chez des patients ayant des PVNH bilatérales et symétriques (Battaglia et al., 2006). Bien que les PVNH soient souvent mises en lien avec de l'épilepsie pharmaco-résistante, une étude récente incluant une large cohorte de patients a mis en avant que seulement 23% des patients répondaient aux critères de l'épilepsie pharmaco-résistante, et que 45% avaient des crises contrôlées, ce qui contredit ce qui a souvent été décrit au sein de la littérature (Paliotti et al., 2023). Dans l'ensemble, les résultats cliniques, d'imagerie et d'anatomo-pathologiques démontrent une grande hétérogénéité clinique des PVNH (Pisano et al., 2012). Au sein de la littérature, il a longtemps été supposé que la taille et le nombre des nodules pouvaient influencer le phénotype épileptique. Cependant, il ne semble pas y avoir de corrélation entre la taille et le nombre de nodule et les troubles cognitifs ou encore la sévérité de l'épilepsie (Parrini et al., 2006, et Parrini et al., 2016). De plus, seulement 6% des cas présentent des décharges épileptiformes issus purement des hétérotopies (Pizzo et al., 2017). Ainsi, la majorité des crises débutent au sein des zones corticales adjacentes à la malformation, donc du cortex normotopique (crises normotopiques), ou impliquent à la fois le cortex et l'hétérotopie (crises normo-hétérotopiques) (Battaglia et al., 2006 ; Pizzo et al., 2017). De plus, des patients avec des mutations dans des gènes impliqués dans l'étiologie des PVNH, mais sans nodules visibles à l'IRM peuvent présenter une épilepsie (Hiromoto et al., 2020). Ces données soutiennent l'hypothèse qu'un dysfonctionnement des circuits corticaux pourrait conduire à des épilepsies et des troubles cognitifs dans les PVNH.

Les hétérotopies nodulaires périventriculaires

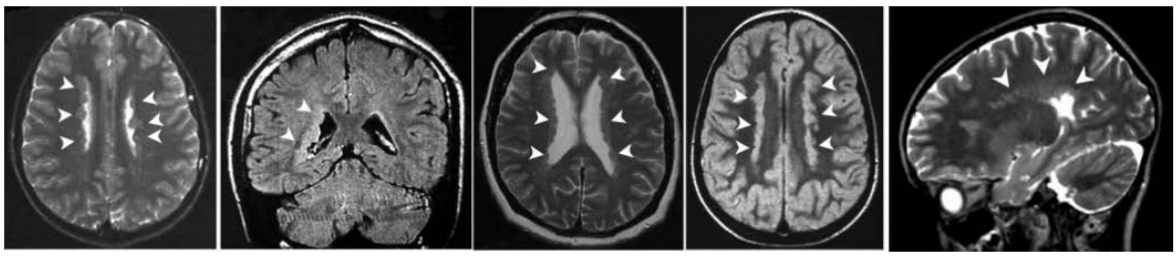


Figure 30. Les hétérotopies nodulaires périventriculaires. IRM de cinq patients présentant des PVNH bilatérales ou unilatérales. Les nodules se caractérisent par des amas de neurones ectopiques le long des ventricules latéraux (flèches blanches). Adapté de *Parrini et al., 2006.*

2.2 Origines génétiques et mécanismes cellulaire et moléculaire associées au PVNH

Les mutations dans le gène *FLNA* (Xq28) représentent la cause majeure des PVNH, environ 50% des cas (Guarnieri et al., 2018). *FLNA* code une grande une protéine de liaison à l'actine et qui stabilise le cytosquelette et participe aux adhérences focales des RGa le long de l'épithélium ventriculaire (Fox et al., 1998 ; Parrini et al., 2016). De plus, les mutations de *FLNA* sont retrouvées dans 100% des cas familiaux de PVNH bilatérales et chez 26% des cas sporadiques (Fox et al., 1998 ; Parrini et al., 2006). Les patients présentent également des malformations cardiaques, et les hommes peuvent présenter des malformations de l'intestin (Parrini et al. 2016). Il a récemment été mis en évidence que certains patients présentant des mutations sur le gène *FLNA* ne présentaient pas de PVNH bilatérales, soulignant la grande hétérogénéité de cette pathologie (Hiromoto et al., 2020). Le gène étant porté par le chromosome X, il existe un taux élevé de létalité prénatale chez les fœtus mâles dû à des malformations trop sévères. En revanche, quelques rares cas de patients masculins ont été décrits avec des PVNH bilatérales (Parrini et al., 2016 ; Sheen et al., 2001). Chez les femmes, un niveau cognitif normal à « borderline » et de l'épilepsie est observé (Parrini et al., 2016). Les mutations de *FLNA* peuvent être héritées ou germinales *de novo* (faux-sens, non-sens et décalage du cadre de lecture), mais incluent également des délétions et des duplications (Parrini et al., 2006 ; Watrin et al., 2015). De plus, d'autres publications ont décrit de rares variants dans d'autres gènes associés à la présence de PVNH. Par exemple, des mutations du gène *ARFGEF2* ont été décrites chez des patients présentant une PVNH, accompagnée d'une microcéphalie, d'un retard cognitif sévère et d'une épilepsie précoce (Sheen et al., 2003). Ces mutations, peuvent être faux-sens ou avec décalage du cadre de lecture et sont héritées de manière autosomique récessive (Sheen et al., 2003). *ARFGEF2* code une protéine appelée BIG2, qui est impliquée dans la conversion de la guanine diphosphate en guanine triphosphate. Ce processus active des facteurs d'ADP-ribosylation, lesquels régulent le trafic des vésicules et le transport des molécules de l'intérieur de la cellule vers sa surface, où elles peuvent se lier à d'autres molécules ou être sécrétées (Sheen et al., 2003). D'autres formes génétiques de PVNH ont été associées à des réarrangements chromosomiques, en particulier des délétions dans la région 6q25 et 6q27 (Conti et al., 2013 ; Peddibhotla et al., 2015). Cette région contient le gène *ERMARD* (C6orf70), code pour une protéine contenant deux domaines transmembranaires, associée au trafic

vésiculaire et impliquée dans la migration neuronale (Conti et al., 2013) Aussi, des mutations sur *NEDDL4* ont été identifiées chez des patients présentant des PVNH et des retards développementaux (Broix et al., 2016). Ce gène code une ubiquitine ligase qui joue un rôle important dans la migration neuronale et est associé à la voie de signalisation mTORC1 (Broix et al., 2016). De plus, un patient présentant des mutations homozygotes sur le gène *CRB2* a également été associée à des PVNH et une ventriculomégalie (Slavotinek et al., 2015). *CRB2* code la protéine CRUMBS2, cette famille de protéines CRUMBS sont des protéines transmembranaires impliquées dans l'adhérence cellule-cellule (Slavotinek, 2016). Les CRUMBS forment un complexe dans les AJ et ont un rôle dans l'établissement de la polarité cellulaire. De plus, la délétion de *CRB2* a été mise en lien avec une différenciation neuronale prématurée et une lamination anormale, établissant son rôle dans le développement cortical (Dudok et al., 2016). Enfin, des mutations bialléliques sur des gènes codant pour la paire de cadhérines ligand-récepteur *DCHS1* et *FAT4* entraînent le syndrome de Van Maldergem (Cappello et al., 2013 ; Ivanovski et al., 2018 ; Klaus et al., 2019). Cette maladie multisystémique se caractérise par des déficiences intellectuelles, des malformations crâniofaciales, auditives, rénales, du squelette et des membres, ainsi que par la présence de PVNH (Cappello et al., 2013).

Ainsi, les PVNH résultent principalement de mutations affectant des gènes impliqués dans des mécanismes cellulaires et moléculaires communs. En effet, la perte de la polarité des RGa et la perturbation des AJ jouent un rôle clé dans l'apparition des défauts de migration (Veeraval et al., 2020). Les défauts de maintenance des AJ compromettent l'adhérence et la morphologie des RGa entraînant leur détachement de la surface ventriculaire (Carabalona et al., 2012 ; Ferland et al., 2009). Ce désassemblage des AJ provoque la délamination des RGa et compromet l'intégrité du neuroépithélium (Carabalona et al., 2012). Ainsi, les neurones ne parviennent plus à migrer correctement le long des RGa ce qui entraîne l'apparition des hétérotopies. De plus, la maintenance des cadhérines, qui constituent les AJ, ainsi que la polarisation des RGa dépendent d'interactions étroitement coordonnées entre le traffic vésiculaire et le cytosquelette d'actine (Sheen, 2014 ; Veeraval et al., 2020 ; Zhang et al., 2013). Ces processus sont essentiels à la migration neuronale permettant d'établir le cortex en six couches et leur dysfonctionnement entraîne des hétérotopies. Toutefois, bien que ces mécanismes sous-tendant l'apparition des PVNH soient relativement étudiés, on sait peu de choses sur les neurones déficients qui s'intègrent dans le cortex. De plus, bien que de nombreux gènes causatifs aient été identifiés dans les PVNH, une large proportion de cas sporadiques reste

sans cause génétique définie. Par conséquent, l'étiologie des PVNH demeure en grande partie méconnue.

2.3 Filamine-A

Le gène *FLNA* code pour une protéine qui appartient à la famille des protéines filamines. Cette famille comprend trois homologues : FLNA, FLNB et FLNC. Les deux premiers sont exprimés dans différents tissus tandis que l'expression de FLNC est principalement restreinte aux muscles squelettiques et au myocarde (Zhou et al., 2021). Les protéines filamines contribuent à l'organisation, la stabilité et à la dynamique des F-actine par leur capacité à se lier à l'actine.

2.3.1 La structure de la *FLNA*

FLNA est localisé sur le chromosome X, dans la région q28 et est composé de 47 exons (Fox et al., 1998 ; Patrosso et al., 1994). Il code une protéine qui est un homodimère d'environ 280 kDa, capable de se lier à l'actine et de transduire des signaux (Patrosso et al., 1994 ; Zhou et al., 2021). Chaque monomère de FLNA est composé d'un domaine de liaison à l'actine N-terminal et d'un domaine contenant 24 répétitions d'immunoglobulines (IG), chacune composée de 96 acides aminés (Patrosso et al., 1994 ; Fox et al., 1998 ; Zhou et al., 2021 ; Figure 31). Les IG sont divisées en trois parties, connectées par deux charnières appelées « Hinge 1 » et « Hinge 2 » qui sont également des sites de clivage protéolytique (Fox et al., 1998 ; Zhou et al, 2021). La première partie, localisée en N-terminale, se nomme Rod1 (Rep.1-15) et contient un domaine de liaison à l'actine et un autre domaine de liaison se situe au niveau des Rep9-15. La deuxième partie, Rod2 (Rep.16-23), est une structure compacte formée de domaines double hélice, ce qui lui confère de la flexibilité. La dernière partie, en région C-terminale, Rep.24, permet la formation d'homodimères et de structures en forme de V, conduisant à la réticulation des F-actine et leur organisation en réseaux orthogonaux (Nakamura et al., 2007 ; Figure 31). Par ailleurs, la FLNA a la capacité de se lier aux intégrines, mais les sites de liaison sont masqués et ne sont exposés que lorsqu'une force mécanique est appliquée (Pentikäinen & Ylänne, 2009).

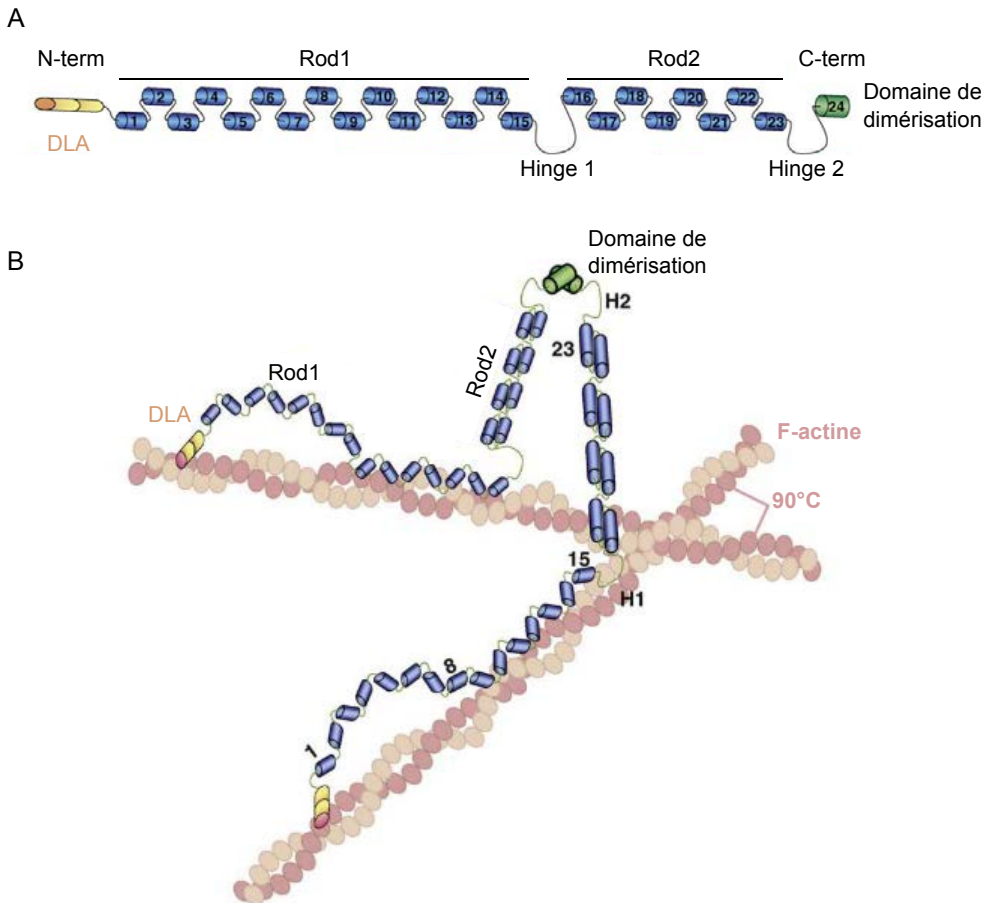


Figure 31. La structure de la FLNA. (A) Représentation d'un brin monomère de la FLNA composé d'un domaine de liaison à l'actine (jaune), de deux domaines Rod (bleu) et d'un domaine de dimérisation (vert) séparés par deux charnières Hinge 1 et 2. (B) Représentation d'un homodimère de FLNA connecté par leur domaine de dimérisation (vert). Le ABD et les Rep.9-15 sont liés à la F-actine, permettant son organisation en réseaux orthogonaux. Adapté de *Zhou et al., 2010.*

2.3.2 Les fonctions de la *FLNA*

La FLNA remplit de nombreuses fonctions, notamment la transduction du signal, la modulation du cytosquelette et la motilité cellulaire. Sa distribution spatiale, à la fois sur l'extrémité de guidage et à l'arrière des cellules en migration, ainsi que sa capacité à se lier aux F-actine lui permettent de contribuer à leur stabilisation et leur remodelage favorisant la motilité cellulaire (Zhou et al., 2010). De plus, la capacité des récepteurs d'adhérence cellulaire à transduire des signaux à travers la membrane repose sur leurs interactions avec le cytosquelette de F-actine. C'est dans ce contexte que la FLNA joue un rôle crucial. Grâce à sa capacité à se lier d'une part à des récepteurs d'adhérence transmembranaires tels que les intégrines et d'autre part à interagir avec les F-actine, elle

joue un rôle crucial dans la transduction du signal (Zhou et al., 2010). Les intégrines permettent le lien physique entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine, via leur liaison à FLNA (Calderwood et al., 2001). Elles favorisent ainsi la stabilisation des adhérences cellule-matrice et facilitent la motilité cellulaire grâce au remodelage de l'actine ce qui permet la migration cellulaire (Calderwood et al., 2001 ; Kim et al., 2008 ; Zhou et al., 2010). Lorsque les intégrines se lient à des ligands de la matrice extracellulaire, elles activent des petites GTPase, qui permettent la polymérisation de l'actine et la formation des lamellipodes et des filopodes (Zhou et al., 2010). De plus, la FLNA interagit avec ces petites GTPases telles que Rac, Rho, Cdc42 et RalA (Ohta et al., 1999 ; Zhou et al., 2010 ; Figure 32). La FLNA ancre les facteurs de signalisation GTPases à proximité de la membrane cellulaire et coordonne leurs activités de remodelage de l'actine (Zhou et al., 2010). La FLNA interagit également avec Pak1, un effecteur en aval de Rac1 et de Cdc42 (Vadlamudi et al., 2002 ; Zhou et al., 2010). Pak1 est activé en se liant à la FLNA, ce qui entraine sa phosphorylation. Cette interaction est nécessaire pour l'assemblage du cytosquelette d'actine régulé par Pak1 (Vadlamudi et al., 2002 ; Zhou et al., 2010). La FLNA forme aussi un complexe avec ROCK, un effecteur en aval de Rho, qui peut être phosphorylé et activer la myosine II, favorisant l'activité contractile des cellules (Zhou et al., 2010). La FLNA peut se lier avec FilGAP, une protéine dépendante de Rac, via sa Rep.23 situé sur Rod2. Cette interaction entraîne l'inactivation de Rac, ce qui permet de supprimer les protrusions au niveau de l'extrémité de guidage – en d'autres termes, cela régule la formation des lamellipodes - et favorise la rétraction des cellules pour maintenir la polarité cellulaire (Nakamura et al., 2009 ; Ohta et al., 2006). A travers ces interactions, FLNA joue un rôle notable dans l'ancrage des récepteurs d'adhérence et des protéines de signalisation au cytosquelette d'actine en servant de point de rencontre pour ces protéines.

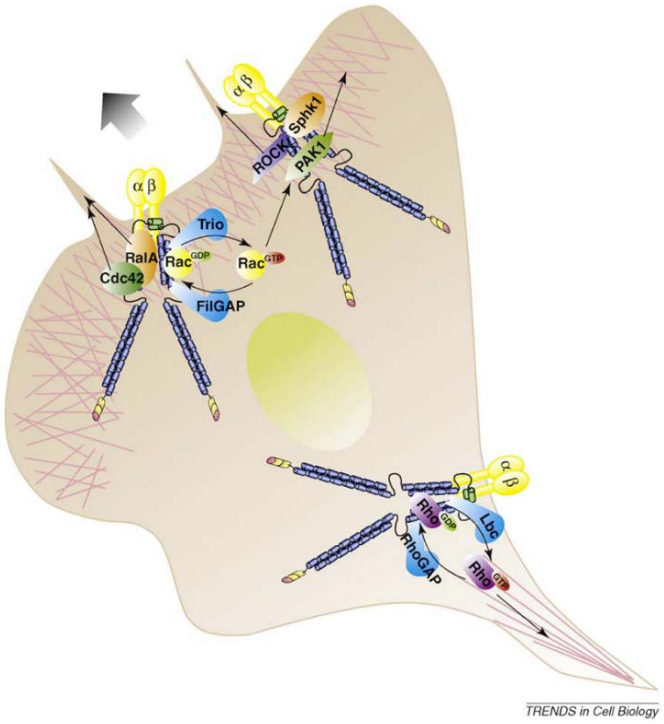


Figure 32. La FLNA et les GTPases. La FLNA sert de support pour les petites GTPases lors de la motilité cellulaire. La membrane du bord d'attaque à l'avant des cellules mobiles réalise de nombreux mouvement nécessitant l'assemblage et l'organisation des réseaux et des F-actine. La FLNA assure la connexion entre les F-actine et les protéines transmembranaires telles que les β-intégrines. Elle interagit également avec les petites GTPases (Cdc42, Rho, Rac, RalA) ainsi que leurs régulateurs en amont (Trio, Lbc, RhoGAP) et en aval (ROCK, PAK1). *Zhou & al., 2010.*

La Flna joue un rôle majeur dans la motilité cellulaire ainsi que dans l'organisation des RGa ce qui influence les processus de neurogenèse et de migration neuronale. Afin d'étudier son rôle dans le développement cortical et d'améliorer la compréhension des mécanismes sous-jacents à l'apparition des PVNH la génération de modèle murin adapté est indispensable. Les modèles murins sont des modèles de choix car ils partagent de grande similitude développementale avec l'humain. Il existe différentes manières de générer un modèle animal. La première est l'utilisation de la technique d'électroporation *in utero* (IUE) qui permet de surexprimer ou d'inactiver par ARN interférent un gène d'intérêt. Dans le but d'étudier le rôle de Flna dans la migration neuronale, des IUE induisant la surexpression d'une forme tronquée de Flna dépourvue de domaine de liaison à l'actine chez des rats *in vivo* ont été réalisées. Il a été observé que cette surexpression entraîne des défauts de polarité des neurones en migration, une incapacité à acquérir une morphologie bipolaire, ainsi qu'une perte de motilité neuronale dans la SVZ et IZ (Nagano et al., 2004). Pour appuyer ce propos, il a récemment été montré que la signalisation de LPA-LPA4 (acide lysophosphatidique et son récepteur) en tandem avec

Flna contribue à l'établissement d'une morphologie bipolaire dans les neurones en migration et donc favorise la transition multi-bipolaire (TMB) (Kurabayashi et al., 2018). Cependant, les défauts de polarité et de migration neuronale résulteraient non seulement de la capacité de la Flna à moduler le cytosquelette d'actine durant la migration radiale, mais également en altérant l'organisation des RGa (Carabalona et al., 2012 ; Nagano et al., 2004). Ainsi, l'inactivation de FLNA par IUE à l'aide d'ARN interférents chez le rat, engendre des défauts dans la progression des progéniteurs dans leur cycle cellulaire et leur migration (Carabalona et al., 2012). Cela affecte directement la migration radiale des neurones post-mitotiques dans la VZ, un phénotype observé chez les patients présentant des PVNH (Carabalona et al., 2012). Un autre modèle est la souris knockout, un modèle obtenu par l'utilisation d'un système Cre-Lox. Les cassettes Lox se situent de part et d'autre des exons 3 et 7 du gène *Flna*. L'injection de la CRE en IUE ou par croisement avec des souris exprimant la Cre, cela permet l'excision des exons contenu au sein des casettes Lox. Dans le cas de la souris *Flna*$^{flx/flx}$, la protéine Flna est ainsi tronqué (Feng et al., 2006). Ce modèle présente un taux de léthalité élevé chez les souris mâles du fait de grosses anormalies cardiaques mais ne présente pas de PVNH (Feng et al., 2006). Cependant, la Flna et Flnb sont coexprimées dans la VZ et SVZ et peuvent former des hétérodimères (Sheen et al., 2002). Flna et Flnb sont exprimées dans le corps cellulaire et le prolongement de guidage des neurones en migration indiquant que ces deux partenaires ont possiblement un rôle fonctionnel redondant (Sheen et al., 2002). Sur la base de cette hypothèse, un modèle de souris *Flna*^{cKO}*Flnb*^{KO} (*Fln*^{cKO}) a été généré et ce modèle présente des PVNH (Feng et al., 2006 ; Houlihan et al., 2016 ; Kopsidas et al., 2024 ; Lu et al., 2007). Les nodules apparaissent aux alentours de E14.5, persistent en post-natal et leur taille continue d'augmenter aux stades adultes (Houlihan et al., 2016 ; Kopsidas et al., 2024). De plus, ces altérations sont accompagnées d'une augmentation du potentiel neurogénique des IP (Houlihan et al., 2016). De surcroit, les neurones présents dans les hétérotopies sont dans un état de quiescence. Bien que ces neurones ectopiques soient incapables de s'intégrer dans le réseau, ils partagent un transcriptome ressemblant aux neurones corticaux des couches corticales superficielles. En revanche, ils présentent une expression réduite des gènes liés à l'activité neuronale, accompagnée d'une augmentation de la densité des épines dendritiques, signature de l'altération des caractéristiques morpho-fonctionnelles des neurones *Fln*^{KO} (Kopsidas et al., 2024).

En revanche, bien que les mécanismes conduisant à la présence de neurones ectopiques bordant le ventricule soient relativement bien compris, la physiopathologie

sous-jacente à la genèse des crises d'épilepsies reste moins claire. En effet, les crises d'épilepsies chez les patients PVNH sont variables d'un patient à l'autre et elles peuvent être initiées exclusivement à partir des hétérotopies (crises hétérotopiques), mais, le plus fréquemment à la fois au sein du cortex normotopique et des hétérotopies (crises normo-hétérotopiques) ou du cortex normotopique (Boulogne et al., 2022 ; Pizzo et al., 2017). De plus, chez un même patient, la genèse des crises peuvent avoir des origines différentes d'une crise à l'autre (Boulogne et al., 2022). Il est également important de souligner que ces observations proviennent de patients explorés par stéréo-électroencéphalographie (SEEG) en vue d'un traitement chirurgical d'une épilepsie pharmaco-résistante mettant de côté de nombreux patients PVNH dont l'épilepsie ne peut être traitée. Ainsi, la compréhension des mécanismes sous-jacents à la genèse des crises d'épilepsies restent un enjeu pour mieux comprendre la physiopathologie des PVNH. En revanche, il est important de souligner que la majorité des crises sont normo-hétérotopiques ou normotopique. Ces données suggèrent que les neurones déficients pour les gènes impliqués dans l'étiologie des PVNH pourraient être intégrés dans le cortex et contribuer aux circuits corticaux dysfonctionnels qui sous-tendent à l'apparition des crises. De ce fait, l'investigation des processus critiques à l'établissement d'une connectivité neuronale tels que la maturation neuronale est un point d'entrée à une meilleure compréhension de la pathogenèse des PVNH.

Ainsi, comprendre le rôle de la FLNA dans la maturation neuronale et dans l'intégration des réseaux corticaux est crucial pour accéder à une meilleure compréhension de ces pathologies. Une partie de mes travaux de thèse a donc consisté à étudier comment les neurones, bien positionnés mais déficients en FLNA, maturent et s'intègrent dans les réseaux corticaux, de même que les voies de signalisation impliquées dans la régulation de ces processus.

2.4 Investigation d'un cas d'HNP à l'étiologie inconnue

De nombreux gènes causatifs ont été identifiés dans les PVNH. En revanche, pour la majorité des cas sporadiques, l'origine génétique des PVNH reste inconnue. Il est donc crucial de découvrir de nouveaux gènes candidats afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents aux PVNH. Grâce à la collaboration entre mon équipe et des cliniciens, nous avons pu obtenir des échantillons de tissus et d'ADN d'un fœtus de 24 semaines. A l'examen neurophatologique, le fœtus présentait des

PVNH bilatérales et une ventriculomégalie, associées à d'autres anomalies cérébrales : des anomalies de la ligne médiane avec agénésie septale, un trouble partiel de la décussation rhombencéphalique, et des anomalies du système épendymaire avec des atrésies étagées (aqueduc, canal épendymaire) ainsi que des PVNH bilatérales et une ventriculomégalie (Figure 33).

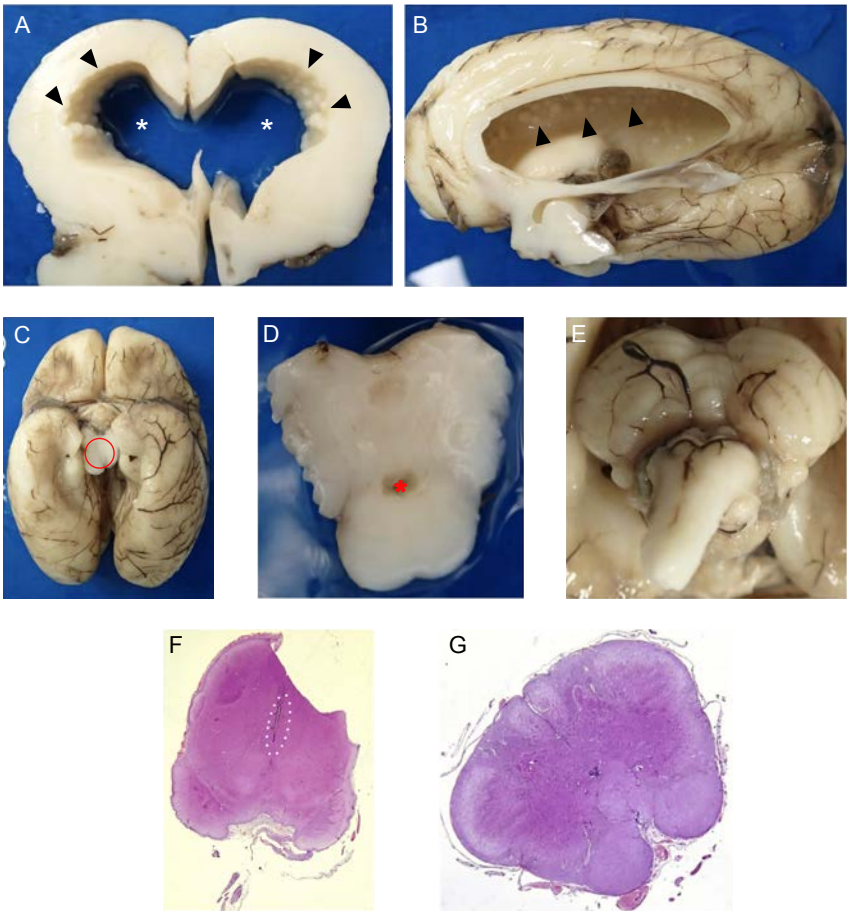


Figure 33. Le cas clinique. Examen macroscopique du fœtus de 24 semaines. (A) Vue coronale, montrant la présence d'HNP bilatérales le long des ventricules (flèches noires), associées à une ventriculomégalie (*). (B) Vue latérale, montrant la présence d'HNP bilatérales le long des ventricules (flèches noires). (C) Le patient présente une microcéphalie, le cerveau est de taille inférieure à la moyenne. L'aqueduc présente une atrésie (rond rouge), ce qui empêche l'écoulement du liquide céphalorachidien et peut-être responsable de l'hydrocéphalie. (D) Sténose du 4ème ventricule. (E) Le cervelet est petit. (F) L'aqueduc est sténosée quasi complètement. (G) Sténose du V4, débutant dans le pont et s'étendant jusqu'à la moelle.

Il n'y avait aucun antécédent familial ni de consanguinité chez les parents. De plus, le fœtus ne présentait pas de mutation sur les gènes connus responsables de PVNH bilatérales, comme la *FLNA*, ni sur des gènes associés à des hydrocéphalies sévères,

comme *MPDZ* (Saugier-Veber et al., 2017). Le séquençage à haut débit de l'exome du patient et de ses parents nous a permis d'identifier de nombreuses mutations présentes chez le fœtus. Nous avons établi une procédure de classification de ces mutations afin de sélectionner un gène pouvant être responsable du phénotype observée (cette stratégie est décrite dans la partie résultats – Partie II.1). Cette stratégie nous a permis de proposer que des mutations faux-sens d'origine hétérozygote *compound* sur le gène *FAT1* pourraient être responsables de la présence des PVNH. Le gène *FAT1* code une cadhérine atypique dont le rôle dans le développement cérébral n'a été que peu étudié. De plus, des mutations sur le couple ligand-récepteur des cadhérines atypiques *FAT4-DCHS1* ont déjà été mis en lien avec les PVNH, laissant fortement supposer d'un lien entre les cadhérines atypiques et les PVNH (Cappello et al., 2014). C'est dans cette perspective que mon travail de thèse s'est concentré sur l'exploration du rôle de Fat1 dans le développement cortical.

Chapitre III : Les cadhérines atypiques FAT

1. La grande famille des cadhérines

1.1 Généralité sur les cadhérines

1.1.1 La structure des cadhérines

L'adhérence cellulaire est un principe fondamental pour l'établissement des contacts entre les cellules. L'adhérence cellulaire permet la reconnaissance et la communication entre les cellules. Elle permet également de percevoir les informations extracellulaires environnantes et celles des partenaires adjacents. Ces interactions déclenchent des réponses intracellulaires qui régulent de nombreux processus durant le développement cérébral. L'adhérence cellulaire est assurée, entre autres, par une grande famille de protéines nommée cadhérines. Les cadhérines sont des protéines d'adhérence transmembranaires dépendantes du calcium, qui partagent un ectodomaine composé de répétitions en tandem de domaines cadhérines (Takeichi, 1977 ; Yoshida-Noro et al., 1984). Chaque répétition de cadhérines est composée de sept feuillets organisés en baril-β, où les extrémité N et C sont situées sur des côtés opposés, ce qui permet aux domaines d'être disposés en tandem (Shapiro et al., 1995 ; Figure 34. A). La connexion entre ces répétitions de cadhérines est rigidifiée par la présence de sites de liaisons au Ca^{2+}, qui permettent la liaison de trois ions Ca^{2+} et protègent le domaine de la protéolyse (Pokutta et al., 1994 ; Shapiro et al., 1995 ; Takeichi, 1977). Cette rigidification permet à l'ectodomaine d'adopter une forme de croissant de 90°, essentielle à la liaison entre les domaines de répétition de deux cadhérines (Boggon et al., 2002 ; Pokutta et al., 1994 ; Figure 34. B). Les cadhérines ont la particularité de former des liaisons homophiliques, c'est-à-dire que deux cadhérines identiques peuvent se lier entre elles, ce qui permet l'adhérence cellulaire. Elles peuvent se lier en *trans*, c'est-à-dire entre deux cadhérines provenant de deux cellules différentes, ou en *cis*, entre deux cadhérines proximales issues de la même cellules (Boggon et al., 2002 ; Figure 34. C). En revanche, plus le nombre de répétitions de cadhérine est grand, plus il peut contenir certaines répétions dépourvues de liaison au Ca^{2+} (Jin et al., 2012). Cela favorise à l'inverse la flexibilité de l'ectodomaine, permettant la modulation de sa conformation et son repliement en structure plus

globulaire (Jin et al., 2012). Dans l'ensemble, le Ca^{2+} influence la conformation des cadhérines et leur adhérence entre elles.

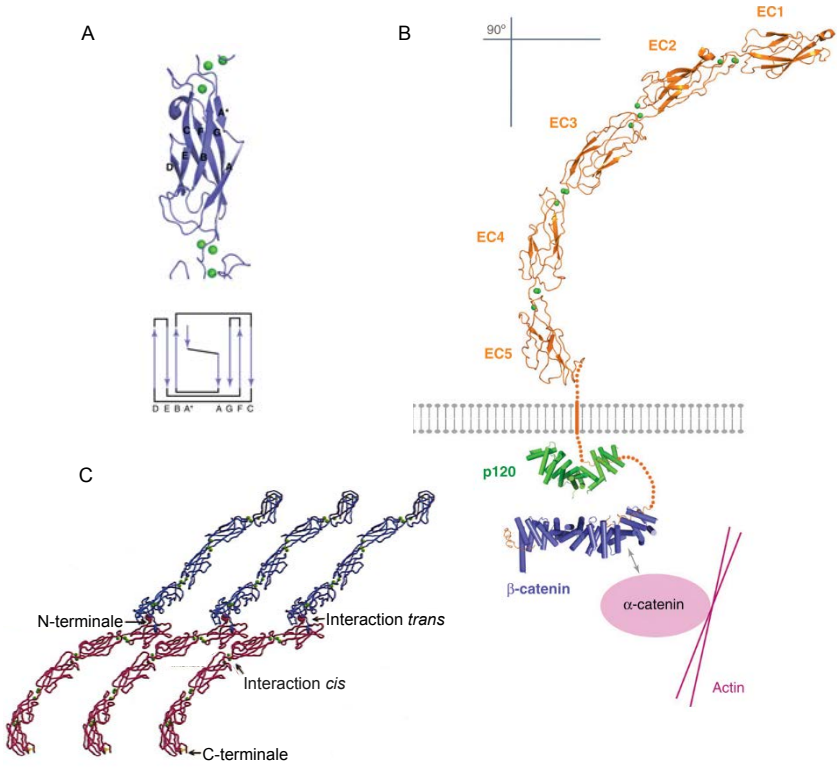


Figure 34. La structure et les interactions des cadhérines. (A) Organisation d'une répétition de cadhérines formée de 7 feuillets (en violet) repliés en forme de baril. À chaque extrémité de la répétition de cadhérines se trouvent les domaines de liaison au Ca^{2+}, capable de lier trois ions (en vert). (B) Représentation schématique d'une cadhérine classique dont l'ectodomaine et arrangé selon un angle de 90°. La cadhérine contient un ectodomaine composée de répétition de cadhérine, ancrée dans la membrane par un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire capable de se lier à caténine p120 et la β-caténine. (C) Illustration des interactions *trans*, entre deux cadhérines issues de cellules différentes, et interactions *cis*, entre deux cadhérines proximales issues d'une même cellule. Abréviation : EC : répétition de cadhérine. Adapté de Brasch et al., 2012 *et de Boggon et al., 2002.*

1.1.2 La superfamille des cadhérines

La famille des cadhérines est très étendue, avec plus d'une centaine de membres identifiés chez l'Homme. Les cadhérines sont classées en fonction de leur structure, qui diffère notamment par le nombre de motifs cadhérines, de leur fonction et de leur domaine intracellulaire (Brasch et al., 2012 ; Gul et al., 2017 ; Nollet et al., 2000). En revanche, leur classification ne fait pas consensus et varie d'un article à l'autre. La seule convention est que toute protéine qui contient un domaine de répétition de cadhérine est considérée comme une cadhérine. La classification présentée dans le paragraphe suivant

est celle qui parait la plus cohérente à travers la littérature. Ainsi, en raison de leur grand nombre et leur diversité, cette superfamille de protéines est divisée en trois familles principales : (1) les cadhérines classiques, (2) les protocadhérines et (3) les protéines apparentées aux cadhérines ou cadhérines atypiques. Au sein de ces trois familles, elles sont à nouveau subdivisées en sous famille : (1) les cadhérines de type I, les cadhérines de type II, les desmosomales et les flamingo ou CELSR ; (2) les protocadhérines et les protocadhérines clustérisées ; (3) les calsynténines et les cadhérines atypiques FAT et Dachsous (Dchs) (Gul et al., 2017 ; Nollet et al., 2000 ; Figure 35).

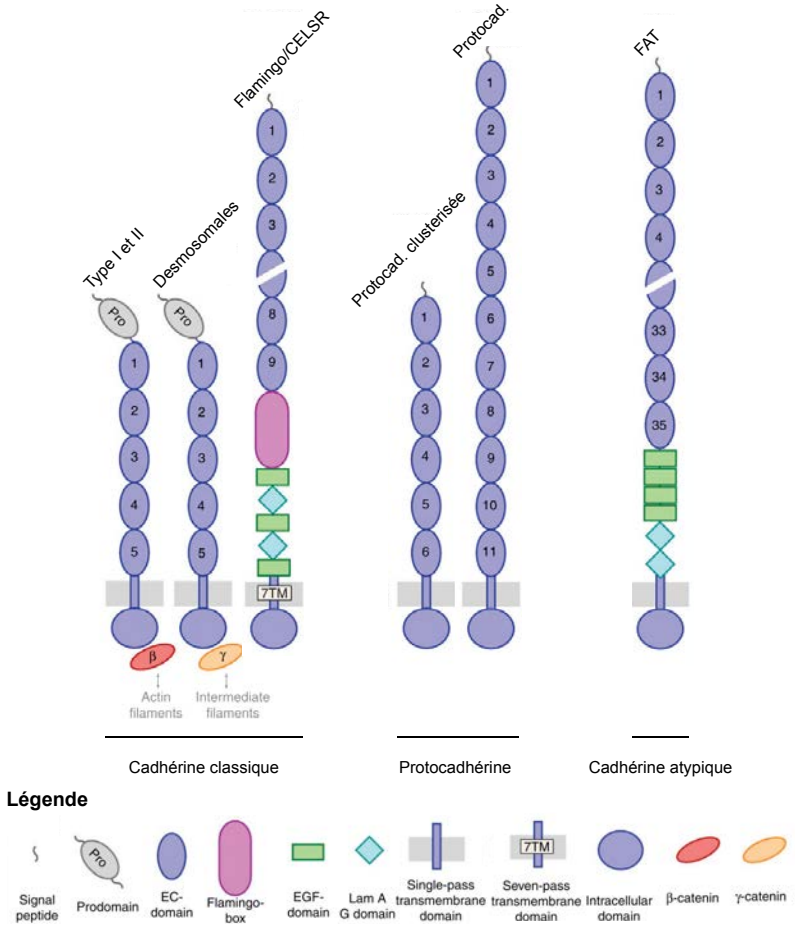


Figure 35. La superfamille des cadhérines. Schématisation de la classification des différentes familles et sous-familles principales de cadhérines, ainsi que leurs caractéristiques structurelles. Adapté de *Brasch et al., 2012.*

La famille la plus largement étudiée est celle de cadhérines classiques. Les **cadhérines de type I et de type II** sont des protéines transmembranaires contenant cinq domaines de répétitions de cadhérine dans leur ectodomaine ainsi qu'un domaine cytoplasmique court et conservé (Brasch et al., 2012 ; Shapiro & Weis, 2009). Ces

cadhérines se trouvent notamment au niveau des jonctions adhérentes et permettent l'adhérence cellule-cellule (Shapiro & Weis, 2009). Leur domaine intracellulaire peut se lier à la β-caténine et à la caténine p120 (Nagafuchi et al., 1991 ; Ohkubo & Ozawa, 1999 ; Ozawa & Kemler, 1992 ; Shapiro & Weis, 2009). La β-caténine peut de son côté se lier à la α-caténine qui peut interagir avec les F-actine, ce qui permet de réguler le cytosquelette d'actine au niveau du contact cellule-cellule (Nagafuchi et al., 1991 ; Ozawa & Kemler, 1992 ; Shapiro & Weis, 2009). La caténine 120 joue un rôle dans la régulation du niveau de cadhérine en contrôlant son taux de renouvellement. De plus, elle peut se lier à des petites GTPases et leur effecteur qui à leur tour régulent le cytosquelette d'actine (Anastasiadis, 2007 ; Shapiro & Weis, 2009). Au sein de la même famille, on trouve les **cadhérines desmosomales** (les desmogléines et les desmocollines) qui ont une organisation similaire aux cadhérines classiques. En revanche, elles sont ancrées par des protéines cytoplasmiques, nommée plakophiline et plakoglobine, qui les relient à des filaments intermédiaires (Nollet et al., 2000). Elles permettent de former des jonctions nommées desmosomes entre des cellules dans des tissus exposés à un stress mécanique élevé comme l'épiderme et le myocarde (Brasch et al., 2012 ; Green & Simpson, 2007 ; Nollet et al., 2000). Ces cadhérines sont également impliquées dans la signalisation cellulaire et le processus de différenciation (Green & Simpson, 2007). Une autre sous-famille est celle des **cadhérines Flamingo/CELSR**. Elles possèdent neuf répétitions de cadhérines, un domaine EGF, un domaine similaire à la laminine-G et aux récepteurs hormonaux, ainsi qu'une structure transmembranaire à sept passages, unique dans la superfamille des cadhérines (Brasch et al., 2012 ; Hulpiau & van Roy, 2009).

La famille la plus conséquente et celle des protocadhérines. Elles contiennent un domaine transmembranaire et possèdent six à sept domaines de répétition de cadhérines (Brasch et al., 2012). Les **protocadhérines non clustérisées** sont principalement exprimées dans le système nerveux et jouent un rôle important dans la formation et la maintenance des circuits neuronaux (Kim et al., 2011 ; Lefebvre, 2017). Elles favorisent l'adhérence cellule-cellule et permettent de réguler de nombreuses molécules effectrices de voies de signalisation (Kim et al., 2011) Les **protocadhérines clustérisées** jouent également un rôle dans de nombreux processus développementaux (Yagi, 2008). Elles sont capables de réaliser des liaisons homophiliques et des cis-homodimères ainsi que des trans-homodimères pour maintenir l'adhérence cellulaire (Yagi, 2008).

Enfin, les **cadhérines atypiques Fat** possèdent un ectodomaine de 34 répétitions, ce qui fait de ces protéines les plus longues de la superfamille des cadhérines. Les

cadhérines atypiques Dchs possèdent un ectodomaine de 25 répétitions. Leurs structures et leurs rôles sont plus précisément détaillés plus loin dans ce chapitre (Partie 2. Les cadhérines atypiques).

1.1.3 Les fonctions des cadhérines dans le développement

D'un point de vue fonctionnel, les cadhérines jouent un rôle crucial dans l'adhérence cellule-cellule et la reconnaissance cellulaire. Elles ont également un rôle établi dans le développement embryonnaire, la morphogenèse des tissus, la signalisation cellulaire et l'homéostasie (Brasch et al., 2012). Dans cette partie, je vais décrire quelques rôles majeurs des cadhérines au sein du développement corticale afin d'illustrer leurs rôles divers et déterminant dans l'établissement du cortex.

L'adhérence est un mécanisme efficace pour créer des clusters asymétriques de molécules dans les complexes d'adhérence et pour recruter des partenaires d'interaction au sein de l'environnement (Gärtner et al., 2015). Durant le développement, l'adhérence cellulaire permet le maintien de la polarité, la communication entre les cellules, le recrutement de voies de signalisation, ainsi que la modulation du cytosquelette d'actine. Pour toutes ces raisons, l'adhérence cellulaire à un rôle central dans la formation du cortex et intervient à diverses étapes du développement. Tout d'abord, les cadhérines forment les AJ, permettant de maintenir le pied apical et basal des RGa ainsi que leur polarité (Kadowaki et al., 2007 ; Veeraval et al., 2020). Les jonctions adhérentes favorisent l'établissement de la polarité et la communication cellulaire. De plus, elles sont nécessaires pour l'équilibre entre la prolifération et la différenciation neuronale (Veeraval et al., 2020).

Les neurones en migration présentent des molécules d'adhérence cellulaire à leur surface. Cela leur permet d'interagir avec les autres cellules de leur environnement ce qui est essentiel dans leur processus de migration. De nombreuses cadhérines classiques et protocadhérines sont impliquées dans ce processus. La cadhérine classique N-cadhérine (CDH2) est particulièrement notable car elle intervient dans de nombreuses d'étapes (Martinez-Garay, 2020 ; Figure 36). Lorsque les neurones en phase de migration multipolaire se retrouvent dans la VZ/SVZ, la N-cadhérine est requise pour leur orientation radiale (Jossin & Cooper, 2011 ; Figure 36). Par la suite, la N-cadhérine maintient les contacts entre les neurones en migration le long des RGa durant la phase de

locomotion (Shikanai et al., 2011 ; Figure 36). Ces points d'adhérence entre le neurone et le pied de la RGa sont nécessaires pour la translocation du noyau durant la nucléokinèse (Martinez-Garay et al., 2016). De plus, la N-cadhérine promeut la translocation terminale lorsque le neurone atteint les CR dans la MZ (Franco et al., 2011 ; Figure 36). En résumé, la N-cadhérine régule de nombreuses étapes de la migration neuronale en maintenant l'adhérence cellule-cellule et la polarité cellulaire (Martinez-Garay, 2020).

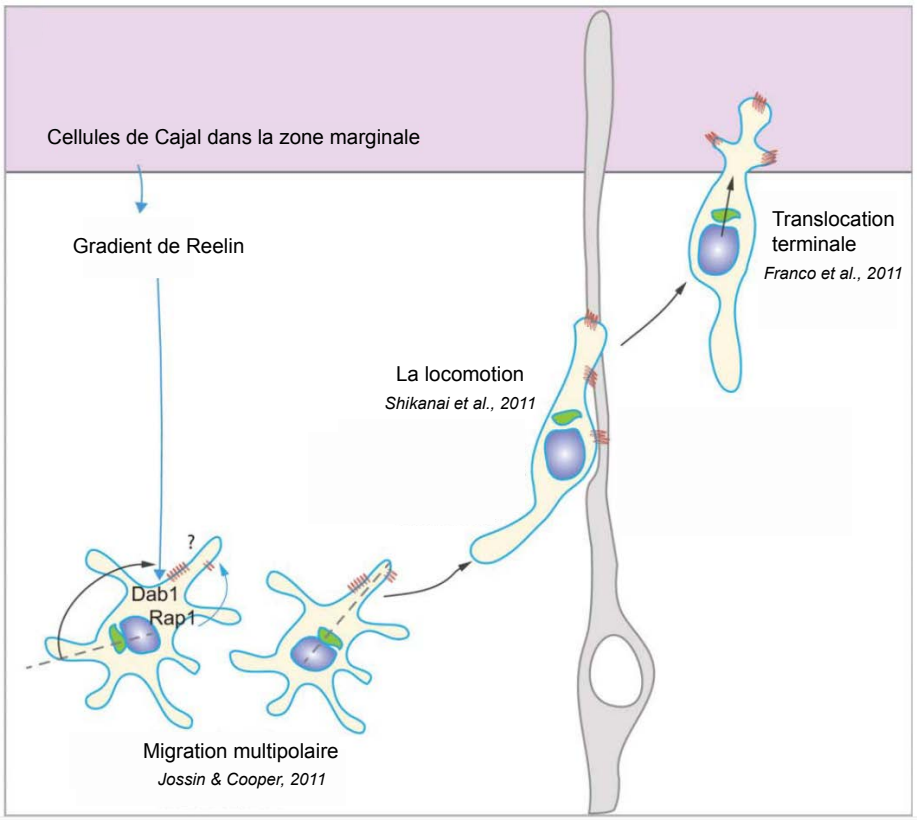


Figure 36. N-cadhérine et migration. Schématisation du rôle de la N-cadhérine (CDH2) à différentes étapes de la migration neuronale. Adapté de *Gärtner et al., 2015.*

Lors des différents processus de maturation, de nombreuses cadhérines jouent un rôle dans l'orientation des prolongements axonaux, l'établissement de l'arborisation dendritique ou lors de la synaptogenèse (Jontes, 2018 ; Lefebvre, 2017 ; Takeichi, 2007). Ce paragraphe mettra l'accent sur le rôle des cadhérines atypiques Flamingo et les protocadhérines clustérisées dans la régulation de l'arborisation dendritique. Lors de l'établissement de l'arbre dendritique, le nombre de dendrites et leur ramification favorisent l'enchevêtrement des branches. En revanche, une disposition non chevauchante favorise l'accès aux entrées synaptiques tout en permettant le

recouvrement optimal de l'environnement. Deux processus évitent l'enchevêtrement : l'agencement (« *tilinig* ») et l'auto-évitement des dendrites entre elles (Lefebvre, 2017 ; Figure 37). Le premier processus permet aux prolongements issus d'un même type neuronal d'avoir des territoires non chevauchants, grâce à la répulsion homotypique. Ce processus est assuré par la cadhérine atypique Flamingo, qui réalise des interactions homophiliques induisant la répulsion entre les dendrites (Kimura et al., 2006 ; Figure 37). L'auto-évitement et la discrimination du soi/non-soi dans les neurones sont contrôlés par les protocadhérines clustérisées (Lefebvre et al., 2012 ; Figure 37). De plus, ces protocadhérines clustérisées régulent l'arborisation dendritiques des neurones pyramidaux à travers des interactions homophiliques locales avec les neurones proximaux (Lefebvre, 2017 ; Figure 37). Elles favorisent également le développement dendritique et la morphogenèse des épines en activant les Rho GTPases, qui régulent le réarrangement du cytosquelette d'actine (Suo et al., 2012). Ainsi, les cadhérines atypiques et les protocadhérines clustérisées participent à l'établissement d'une connectivité neuronale fonctionnelle.

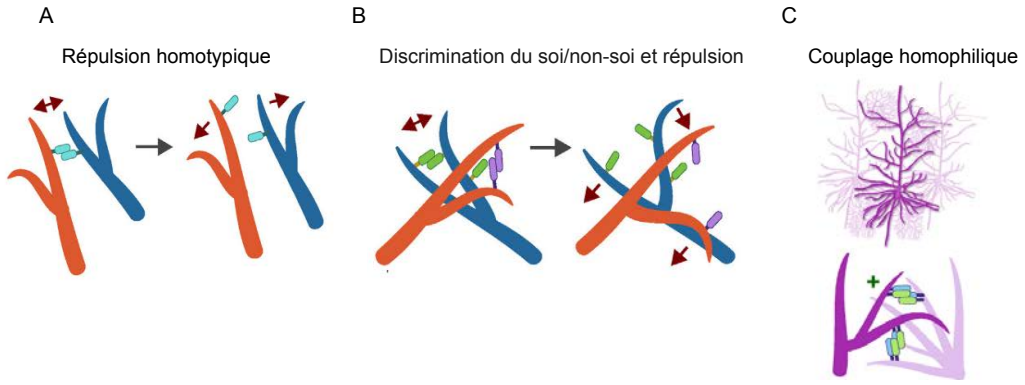


Figure 37. Cadhérines et arborisation dendritique. Illustration des rôles des cadhérines atypiques Flamingo/CELSR et des protocadhérines clustérisées dans (A) la répulsion homotypique, (B) le contact et la reconnaissance du soi et du non soi, ainsi que (B) le couplage homophilique dans l'établissement de l'arbre dendritique. Adapté de *Lefebvre, 2017.*

En résumé, ces quelques exemples illustrent les diverses manières par lesquelles les cadhérines peuvent percevoir des signaux et ajuster leur capacité d'adhérence pour réguler divers processus durant le développement. Cela montre la complexité des diverses voies de signalisation des cadhérines et souligne l'importance de leur régulation spatio-temporelle, cruciale pour les différentes étapes du développement et l'établissement du cortex (Gärtner et al., 2015).

2. Les cadhérines atypiques FAT

2.1 Structure des cadhérines atypiques FAT

Les FAT sont des cadhérines atypiques qui font partie de la superfamille des cadhérines. Cependant, il est important de noter que les protéines FAT sont parfois désignées dans la littérature à la fois comme des protocadhérines ou des cadhérines atypiques. Les FAT contiennent un nombre de domaines de répétitions cadhérines supérieur à celui des protocadhérines. En revanche, elles présentent une ressemblance phylogénétique étroite avec ces dernières dans leur région N-terminale (Brasch et al., 2012 ; Hulpiau & Van Roy, 2011). Du fait de cette ressemblance, certains articles les classent parmi les protocadhérines (Chae et al., 1999 ; Ciani et al., 2003). D'autres auterus estiment que les FAT ne devraient pas être incluses dans cette famille car elles partagent peu de similitudes fonctionnelles (Gul et al., 2017 ; Keeler et al., 2015 ; Kim et al., 2011 ; Nollet et al., 2000 ; Sharma & McNeill, 2013). Dans ce manuscrit de thèse, afin d'éviter toute confusion, je vais me référer aux FAT comme des cadhérines atypiques ou FAT-cadhérines.

Les FAT ont la particularité d'être de très grands récepteurs transmembranaires, comprenant plus de 4500 acides aminés et possédant une taille d'environ 560 kDA. Initialement décrite chez la drosophile dans les années 1920, il existe deux homologues, Fat (*Ft*) et *Ft2* et qui présentent des différences au niveau de leur domaine extracellulaire (Blair & McNeill, 2018 ; Mahoney et al., 1991 ; Mohr, 1923 ; Sharma & McNeill, 2013 ; Tepass, 1999 ; Figure 38). Chez la drosophile, les *Ft* jouent un rôle dans une grande variété de processus (Bennett & Harvey, 2006 ; Peng et al., 2021 ; Zhao et al., 2013). Cela ouvre la voie à l'exploration de la conservation ces processus chez les vertébrés.

Chez les vertébrés, la famille des FAT comprend quatre membres : FAT1, FAT2, FAT3 et FAT4 (Figure 39), suggérant que ces protéines sont très conservées à travers les espèces (Gul et al., 2017 ; Kasiah & McNeill, 2023 ; Rock et al., 2005). Ces protéines se différencient par leur domaine extracellulaire qui comporte entre 32 et 34 répétitions de cadhérines, 1 ou 2 domaines laminine-G et entre 2 et 5 domaines EGF-like (Cox et al., 2000 ; Dunne et al., 1995 ; Peng et al., 2021 ; Rock et al., 2005 ; Sharma et McNeill, 2013 ; Figure 38). Chez l'homme, les gènes *FAT1* et *FAT4* sont localisées sur le chromosome 4, dans la région 4q35.2 et 4q28.1 respectivement. *FAT2* est localisée dans la région 5q33.1 et *FAT3* au niveau de la région 11q14.3. Les protéines Fat1 et Fat4 peuvent également être clivées au niveau N-terminal de la région transmembranaire pour générer des fragments

de 450 kDa et 110 kDa (Sharma & McNeill, 2013 ; Sopko et al., 2009). En outre, les cadhérines FAT ont des domaines cytoplasmiques variables au sein de leur propre famille, ce qui suggère des rôles spécifiques à chaque FAT. Cela leur permet de recruter divers effecteurs intracellulaires, comme des facteurs de transcription ou des régulateurs de l'actine (Avilés & Goodrich, 2017).

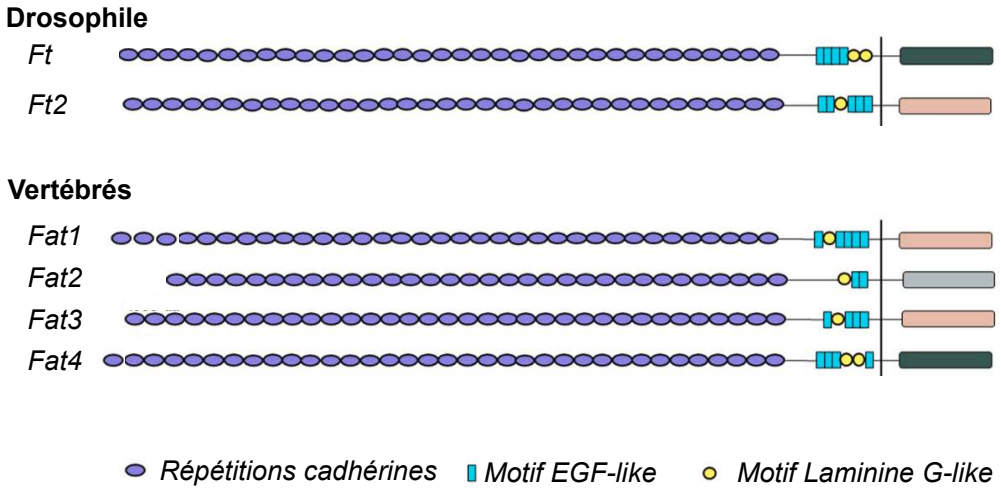


Figure 38. La structure des FAT-cadhérines. Schématisation de la structure des différents homologues des FAT-cadhérines chez la drosophile et chez les vertébrés. Adapté de *Kasiah & McNeill, 2023.*

2.2 Fonction des cadhérines atypiques FAT

2.2.1 Partenaire d'interaction : les cadhérines atypiques Dachsous

DCHS est une grosse protéine transmembranaire de 379 de kDa qui fait partie de la famille des cadhérines atypiques. Elle contient 27 répétions de domaines cadhérines au sein de la région extracellulaire, un domaine transmembranaire et une région intracellulaire (Clark et al., 1995 ; Gul et al., 2017 ; Sharma & McNeill, 2013 ; Figure 39). Chez les vertébrés il existe deux homologues Dachsous1 et Dachsous2 qui contiennent un site de liaison putatif de la β-caténine (Sharma & McNeill, 2013). Les FAT-cadhérines et les Dchs sont regroupées dans la même famille de cadhérine atypiques car elles partagent une grande homologie (Sadeqzadeh et al., 2013). Chez la drosophile, *Ft* et Dchs forment des transhétérodimères (Ma et al., 2003 ; Reddy & Irvine, 2008 ; Sharma & McNeill, 2013). En revanche, chez les vertébrés ces intéraction n'ont été que très peu étudiées et nous ne

savons pas quelle FAT interagit avec quelle Dcsh. Au sein de la littérature, il a été démontré que FAT4 et Dchs1 peuvent se lier activant ainsi des signaux bidirectionnels via leurs domaines intracellulaires ce qui permet de réguler de nombreux processus développementaux dans différents organes (Kasiah & McNeill, 2023 ; Mao et al., 2011 ; Reddy & Irvine, 2008). Enfin, les FAT-Dchs sont également des régulateurs de la voie de signalisation HIPPO/Mst (Sahu & Mondal, 2021).

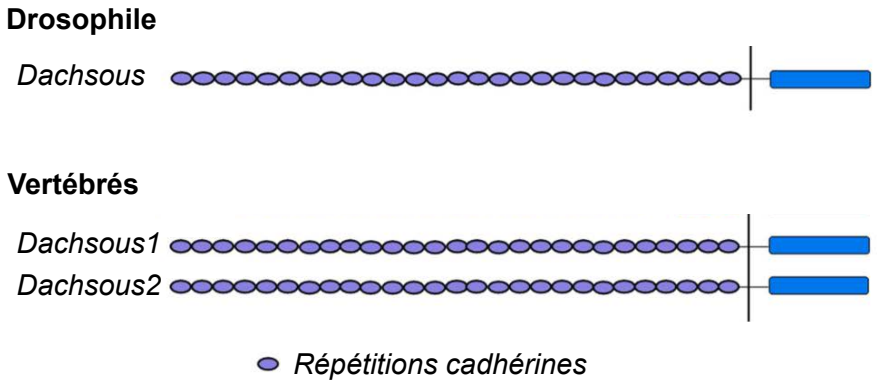


Figure 39. La structure des Dachsous. Schématisation de la structure des différents homologues de Dachsous chez la drosophile et chez les vertébrés. Adapté de *Kasiah & McNeill, 2023.*

2.2.2 La voie de signalisation HIPPO/Mst

Il reste encore beaucoup à découvrir sur l'interaction entre la voie de signalisation HIPPO/Mst et les cadhérines FAT. En revanche il a été mis en avant que Fat1 et Fat4 pouvaient agir sur des effecteurs de cette voie (Ahmed et al., 2015 ; Cappello et al., 2013). La voie de signalisation HIPPO a également été découverte chez la drosophile, où son activation par la liaison de *ft*-Dchs a été décrite (Sharma & McNeill, 2013). Chez les mammifères, l'homologue de HIPPO est Mst (Mst1 et Mst2). Ainsi, tout au long de ce manuscrit je me référerais à cette voie en tant que voie de signalisation HIPPO/Mst.

Cette voie de signalisation comporte 4 acteurs qui sont Lats, Mst, Sav1 (aussi appelée Ww45) et Mob (Reddy & Irvine, 2008 ; Figure 40). L'activation de la voie permet aux kinases Mst de phosphoryler les protéines Lats, SAV1 et Mob (Callus et al., 2006 ; Chan et al., 2005 ; Hirabayashi et al., 2008 ; Praskova et al., 2008 ; Reddy & Irvine, 2008). Les Mst peuvent également être activées par un clivage de la caspase, et son autophosphorylation

est une étape cruciale dans la régulation de la voie Hippo/Mst (Glantschnig et al., 2002 ; Graves et al., 1998). La phosphorylation de Lats requiert Sav1, qui agit comme une protéine d'échafaudage entre Mst et Lats (Callus et al., 2006 ; Chan et al., 2005 ; Lee et al., 2008). Un autre acteur clé, Nf2, facilite la phosphorylation de Lats par Mst et Sav1 (Yin et al., 2013). D'autre part, Lats et Mob s'associent comme des cofacteurs ce qui favorise l'autophosphorylation de Lats (Praskova et al., 2008). Lats phosphoryle à son tour la protéine médiatrice Yes-associated (YAP ; Zhao et al., 2007) et le coactivateur transcriptionnel avec le motif de liaison PDZ (TAZ ; Lei et al., 2008). Ainsi la phosphorylation de YAP et TAZ restreint l'activité du complexe (Hao et al., 2008). De plus, dans cet état phosphorylé, le complexe peut se lier avec 14-3-3 ce qui entraîne leur rétention cytoplasmique et possiblement leur dégradation et ubiquitination (Meng et al., 2016 ; Zhao et al., 2007). En revanche, lorsque Yap et Taz sont actifs, donc lorsque la voie HIPPO/Mst n'est pas activée, ils transloquent dans le noyau pour se lier à la famille des facteurs de transcription TEAD et SMAD (Meng et al., 2016 ; Zhao et al., 2008).

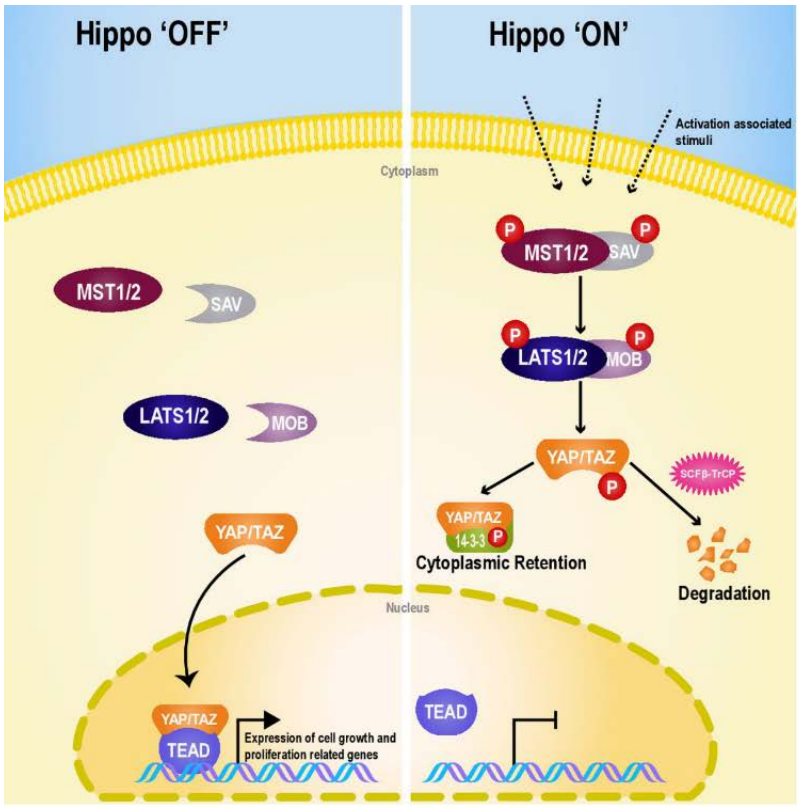


Figure 40. La voie de signalisation HIPPO/Mst. Schématisation de la voie de signalisation HIPPO lors qu'elle est inactive (à gauche) et active (à droite). Adapté *de Sahu & Mondal, 2021.*

La voie de signalisation HIPPO/Mst joue de nombreux rôles au cours du développement cérébral notamment dans de la prolifération cellulaire, de la différenciation neuronale, de la migration et de la maturation neuronale (Meng et al., 2016). Elle peut être régulée de plusieurs manières : par contact mécanique ou cellulaire, via des facteurs solubles et des protéines G couplés à des récepteurs ou par des signaux de stress (Meng et al., 2016). Tout d'abord, la voie Hippo/Mst a un rôle notable dans la prolifération cellulaire et la différenciation neuronale. C'est notamment via l'activation des co-effecteurs YAP/TAZ que la prolifération est régulée (Lavado et al., 2018). Lorsqu'ils transloquent dans le noyau et activent TEAD, cela favorise l'expression de gènes impliqués dans l'augmentation de la prolifération cellulaire, l'inhibition de l'apoptose et la migration (Han et al., 2015 ; Meng et al., 2016 ; Zhao et al., 2008). À l'inverse, NF2 limite l'expansion de la prolifération en supprimant l'activité de YAP/TAZ et participe à la différenciation neuronale (Lavado et al., 2013).

L'activation de la voie de signalisation Hippo/Mst est également observée au cours de la migration neuronale. En effet, l'absence de MOB2 entraîne des défauts de migration neuronale liés à des PVNH (O'Neill et al., 2018). Il a également été montré que la suppression de la voie de signalisation Hippo/Mts entraînait non seulement l'augmentation de la prolifération des progéniteurs mais également une hétérotopie massive (K. Saito et al., 2018). Ainsi, la voie Hippo/Mst régule la migration neuronale et des défauts au sein de cette voie sont mis en lien avec la présence de PVNH.

Le rôle de cette voie de signalisation ne se limite pas seulement à la prolifération et la migration neuronale. Elle a également un impact dans le développement des neurites et le guidage axonal (Sahu & Mondal, 2021). La protéine d'échafaudage Mob2, un effecteur de la voie de signalisation Hippo/Mst, promeut la formation des neurites. Mob2 favorise la phosphorylation de la moesin, une protéine qui lie le cytosquelette d'actine à la membrane plasmique, ce qui induit un réarrangement du cytosquelette d'actine et favorise la neuritogenèse (Lin et al., 2011). Ainsi, la voie de signalisation HIPPO/Mst contribue à de nombreux processus majeurs du développement cortical.

2.2.3 Rôle des FAT dans le développement chez les vertébrés

Les FAT-cadhérines remplissent des rôles divers qui sont très étudiés et décrits chez la drosophile. Bien que certains de ces rôles soient conservés chez les vertébrés, la plupart restent peu décrits. Au sein de cette partie je vais décrire de manière globale le

rôle des Fat afin de mieux comprendre leur contribution lors du développement. En revanche, je développerai les différents rôles et connaissances sur Fat1 dans une partie séparée (partie 3. La cadhérine atypique FAT1.).

La polarité planaire (PCP) réfère à la polarisation des cellules sur un plan bidimensionnel. Ce terme a été introduit pour décrire l'orientation spatiale de structure polarisée, c'est une propriété commune des tissus des animaux où elle est définie comme une polarité dans un autre plan que l'axe apico-basal (Goodrich & Strutt, 2011). Chez la drosophile, la PCP est souvent liée à *Ft-Dchs.* Par ailleurs, les patterns d'expression de Dchs1 et Fat chez la souris en développement suggèrent la conservation de leur rôle dans la PCP chez cette espèce (Rock et al., 2005). Les liaisons hétérophiliques de haute affinité entre Fat4-Dchs1 via leur région N-terminale et leur capacité à former des interactions de longue portée permettent d'expliquer le maintien de la PCP au cours des processus développementaux (Medina et al., 2023 ; Tsukasaki et al., 2014). Les modèles de souris KO pour Fat4 ou Dchs1 présentent des anomalies de développement tels que des reins kystiques, des élargissements du tube neural et de la cochlée qui sont associées à des défauts de PCP (Mao et al., 2011 ; Matis & Axelrod, 2013 ; Saburi et al., 2012). De plus, Fat4 interagit avec Vangl2, un homologue du gène *Vang* impliquée dans la PCP chez la drosophile (Matis & Axelrod, 2013 ; Saburi et al., 2012).

La paire ligand-récepteur Fat4 et Dchs1 a des rôles dans les étapes précoces du développement cortical. En effet, leur inactivation via des ARN interférents délivrés par IUE, conduit à une augmentation de la division cellulaire accompagnée d'une augmentation des RGa ainsi que des retards de migration (Cappello et al., 2013 ; Klaus et al., 2019). Sur le plan clinique, des mutations dans les gènes codant ces protéines sont associées au syndrome de Van Maldergem, une pathologie autosomale récessive qui est caractérisée par une déficience intellectuelle, des malformations multi-systémiques ainsi que des PVNH (Cappello et al., 2013 ; Ivanovski et al., 2018). Fat4 et Dchs1 sont des régulateurs en amont de HIPPO/Mst. En effet, l'inactivation de l'effecteur Yap par miRNA concomitante avec l'inactivation de Fat4 ou Dchs1 par sh_RNA restaure la prolifération des RGa et la migration neuronale (Cappello et al., 2013). Ainsi, Fat4-Dchs1 sont impliqués dans la régulation de la prolifération et dans les processus de migration en agissant sur la voie de signalisation HIPPO/MSt et en particulier sur l'effecteur Yap (Cappello et al., 2013).

De plus, les FAT-cadhérines font partie de la grande famille des cadhérines qui joue un rôle dans les AJ. Dans le cortex en développement, les protéines Fat4-Dchs1 sont

accumulées au niveau des AJ apicales au niveau du contact cellule-cellule et interagissent ensemble (Ishiuchi et al., 2009). Elles participent à l'organisation et au maintien de la membrane plasmique. Pour finir, Fat4 et Dchs1 régulent réciproquement leur quantité protéique (Ishiuchi et al., 2009). Ainsi, bien qu'on leur suppose un rôle assez important dans le développement au vu de leur rôle majeur chez la drosophile, le rôle des Fat-cadhérines dans le développement cortical reste encore mal connu.

3. La cadhérine atypique Fat1

La cadhérine atypique Fat1 est une grosse protéine transmembranaire qui fait partie de la super famille des cadhérines. Chez l'homme *FAT1* est exprimée dans les tissus épithéliaux, fortement dans les intestins et le colon et plus faiblement dans les reins, les poumons et le pancréas, mais également dans certains tissus endothéliaux et des cellules musculaires lisses (Dunne et al., 1995). L'expression de *Fat1* a également été étudiée chez le rat et la souris à des stades embryonnaire et postnataux (Figure 41). *Fat1* est largement exprimée au cours du développement notamment dans des zones présentant des niveaux élevés de prolifération cellulaire (Badouel & al., 2015 ; Cox et al., 2000 ; Ponassi et al., 1999 ; Figure 41). En effet, Fat1 est exprimée précocement au niveau des cellules qui bordent le ventricule qui correspond à la zone germinale VZ et plus faiblement à des stades plus tardifs dans la SVZ (Cox et al., 2000 ; Ponassi et al., 1999 ; Figure 42). Durant l'embryogenèse, Fat1 est également exprimée dans le cerveau moyen, le plexus choroïde, l'œil en développement et dans le gyrus denté de l'hippocampe (Cox et al., 2000 ; Ponassi et al., 1999). À l'âge adulte chez le rat, l'expression de Fat1 persiste dans le SNC, dans la zone sub-épendymaire, le gyrus denté et la couche de cellules granulaires du cervelet (Ponassi et al., 1999). Au vu de son expression dans les zones germinatives du cerveau, cela renforce l'idée que Fat1 joue un rôle important durant les premières étapes du développement. En effet, la cadhérine atypique Fat1 est impliquée dans une multitude de processus tels que l'adhérence cellulaire, la prolifération et la migration neuronale. Pour cela, Fat1 interagit avec de nombreuses voies de signalisation. Dans un premier temps, je détaillerai avec quelles voies de signalisation Fat1 interagit puis je décrirai le rôle de ces interactions dans le développement cortical. Enfin, je détaillerai l'interaction de Fat1 avec certains partenaires afin de mieux comprendre son rôle dans le développement cortical et dans les pathologies associées à des mutations de *FAT1*.

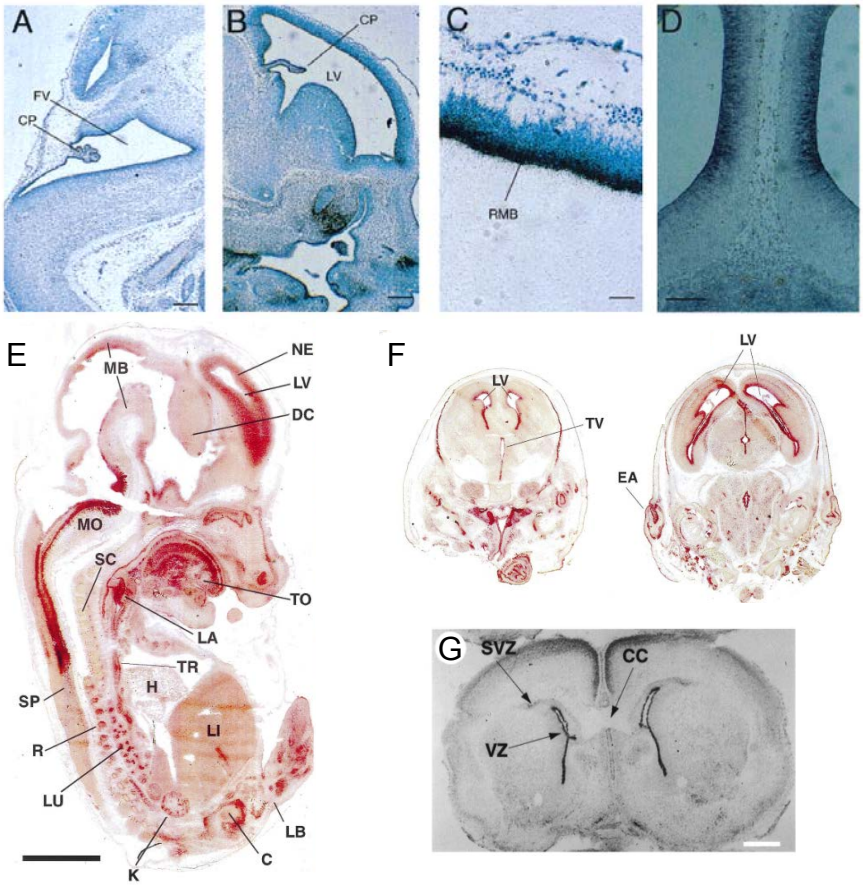


Figure 41. L'expression de Fat1. (A-D) Expression par hybridation *in situ* de l'ARNm de Fat1 dans les zones prolifératives du cerveau de souris à E12.5 (A-B) et E14.5 (D). Abréviations : FV : 4ème ventricule, CP : Plexus chroïdes, LV : Ventricule latéraux, RMB : Mésencéphale *roof*. (E-G) Expression par hybridation *in situ* de l'ARNm de Fat1 dans les zones prolifératives du cerveau de rat a E15 (E-F) et P0 (G). Abréviations : MB : mésencéphale, NE : Neuroépithélium, LV : Ventricule latérale, DC : Diencéphale, MO : Bulbe rachidien, SC : Colonne vertébrale, TO : langue, LA : Larynx, SP : Moelle épinière, TR : Trachée, H : Cœur, R : Côte, LU : Poumons, LI : Foie, K : Reins, C : Cartilage, LB : Membre, TV : 3ème ventricule, EA : Oreille, SVZ : Zone sous ventriculaire, CC : Corps calleux, VZ : Zone ventriculaire. Adapté de *Cox & al., 2000* et *Ponassi et al., 1999.*

3.1 Les multiples rôle de Fat1 dans le développement

Fat1, grâce à son domaine cytoplasmique, possède la capacité de se lier à différents partenaires protéiques et régule de nombreuses voies de signalisation qui ont des rôles dans la régulation de la prolifération, de la différenciation cellulaire ainsi que de la motilité et de la migration cellulaire (Ahmed et al., 2015 ; Hou & al., 2006 ; Sadeqzadeh et al., 2013 ; Tanoue & Takeichi, 2004 ; Figure 42).

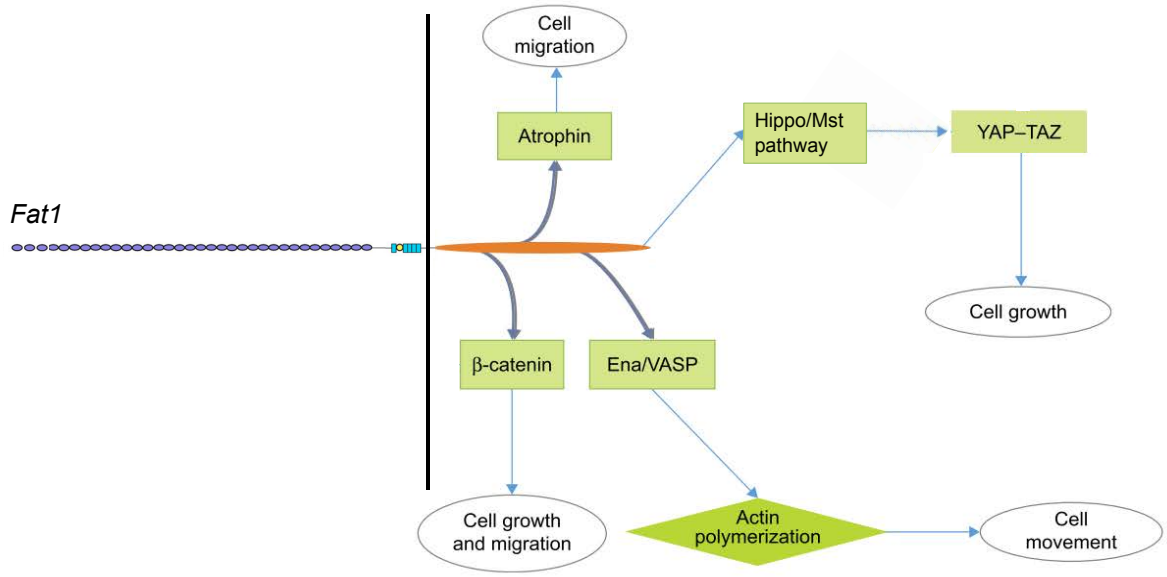


Figure 42. Les partenaires d'interaction de FAT1 et leurs rôles. Adapté de *Kasiah & McNeill, 2023* et *Zhang & al, 2016.*

3.1.1 La régulation de la prolifération et de la différenciation neurale

3.1.1.1 La voie de signalisation HIPPO/Mst

Tout comme son homologue Fat4, Fat1 joue un rôle dans l'activation de la voie Hippo/Mts (Ahmed et al., 2015 ; Martin et al., 2018 ; Peng et al., 2021). Comme précédemment décrit dans la partie précédente (voir 1.1.1. La voie de signalisation HIPPO/Mst), lorsque la voie Hippo/Mts est activée elle agit sur la phosphorylation du complexe Yap/Taz ce qui favorise sa dégradation. Le domaine intracellulaire de Fat1 interagit avec Mst1, Sav1, Nf2 et participe à l'assemblage du complexe protéique Hippo/Mst (Figure 43). Cela permet d'activer Mst1 par les kinases Tao ce qui va induire la phosphorylation ultérieure de Lats et Yap1 (Martin et al., 2018 ; Peng et al., 2021). En revanche, le mécanisme découlant de la phosphorylation de Mst par les kinases Tao n'est pas encore élucidé. Lorsque Fat1 est absent, la voie Hippo/Mst ne s'active pas ce qui favorise la phosphorylation de Taz. Le complexe Yap/Taz transloque dans le noyau et peut se lier à TEAD/SMAD et entraîner la transcription de gènes qui favorisent l'auto-renouvellement et la prolifération cellulaire (Ahmed et al., 2015 ; Figure 43). Lorsque Fat1 active la voie de signalisation Hippo/Mst cela va réprimer l'activité de Taz et entraîner sa dégradation et favoriser la différenciation neuronale (Ahmed et al., 2015 ; Figure 43). Lors de la différenciation neurale, le niveau d'expression de Fat1 augmente ainsi que celui de la synaptophysine, un marqueur de la différenciation. A l'inverse, celui de Nestine, un

marqueur des précurseurs neuronaux, diminue soulignant que FAT1 est un marqueur de la différenciation (Ahmed et al., 2019). Un autre élément indiquant le rôle de Fat1 dans la différenciation, c'est qu'elle joue également un rôle dans la formation des neurites *in vivo* (Ahmed et al., 2019). Le knockdown de Fat1 induit la diminution du nombre de neurites mais pas de leur longueur (Ahmed et al., 2019).

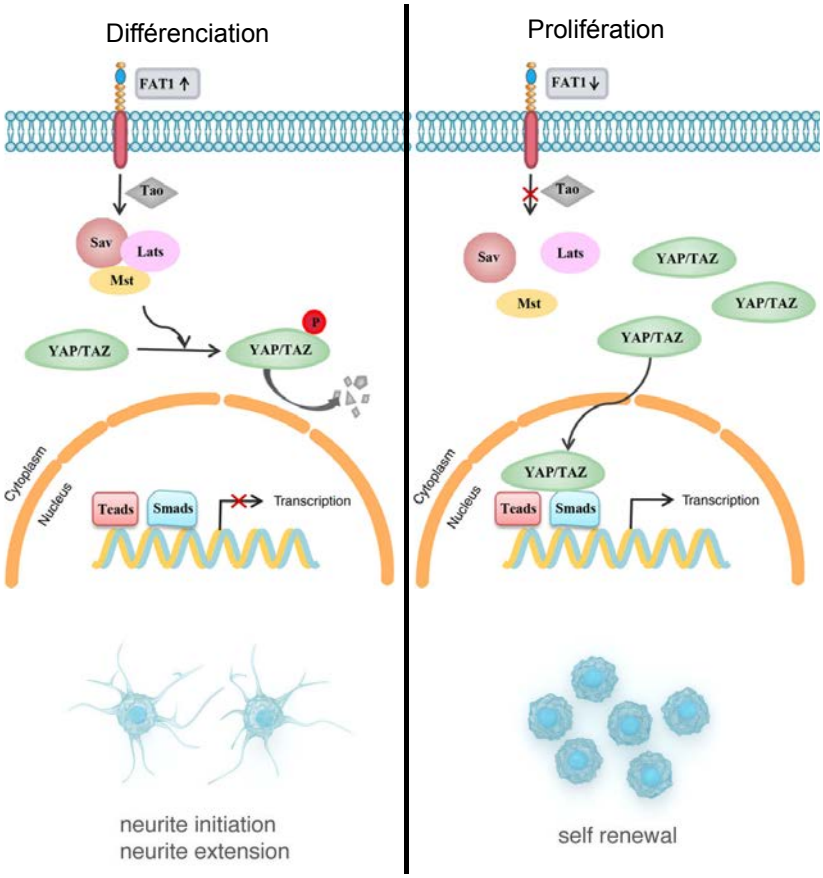


Figure 43. FAT1 et la voie Hippo/Mst dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Adapté de *Ahmed & al, 2015 et Peng & al., 2021*

3.1.1.2 La voie de signalisation Wnt/β-caténine

La voie de signalisation Wtn/β-caténine joue un rôle majeur dans le développement cérébral et notamment lors de l'étape de prolifération cellulaire (partie Chap I. 2.2.2.2 La voie de signalisation Wnt). Pour rappel, cette voie contrôle trois étapes qui sont la transduction du signal à la membrane, la régulation de la β-caténine dans le cytoplasme et l'activation des gène cible de Wnt dans le noyau. Dans l'artère carotide de rat et dans des cellules cancéreuses, Fat1 est capable de se lier via son domaine intracellulaire à la β-caténine (M. Chen et al., 2019 ; Hou et al., 2006). Cette interaction

conduit à la phosphorylation de la β-caténine. Cela l'empêche de transloquer dans le noyau et réprime son activité transcriptionnelle (M. Chen et al., 2019 ; Hou et al., 2006 ; Morris et al., 2013). Cycline D1 est un gène cible de la β-caténine, qui participe à la progression du cycle cellulaire, notamment la phase G1 et a transition à la phase S (Hou et al., 2006 ; Shtutman et al., 1999 ; Tetsu & McCormick, 1999). Lorsque Fat1 se lie par son domaine intracellulaire à la β-caténine, cela entraîne l'inhibition de la Cycline D1 par sa phosphorylation (Hou et al., 2006). Ainsi, l'activité de la voie de signalisation Wnt est diminuée, ce qui réduit la prolifération cellulaire (Hou et al., 2006 ; Morris et al., 2013). En revanche, lorsque Fat1 ne se lie pas à la β-caténine, cette dernière transloque dans le noyau ce qui favorise l'expression de la Cycline D1 qui augmente la transduction de la voie de signalisation Wnt et favorise la prolifération cellulaire (Morris et al., 2013).

3.1.2 La régulation de la motilité cellulaire

Le complexe Mena/*vasodilator-stimulated phosphoprotein* (Ena/Vasp) est constitué de protéines régulatrices de l'assemblage de l'actine et de la motilité cellulaire (Krause et al., 2003). Ena/Vasp se localise au niveau de l'extrémité des lamellipodes et des filopodes, ainsi qu'au niveau des contacts cellule-cellule et des adhérences focales. Il est également capable de se lier directement à la F-actine (Krause et al., 2003 ; Reinhard et al., 1992 ; Rottner et al., 1999 ; Tanoue & Takeichi, 2004). Fat1 interagit avec Ena/Vasp via son domaine cytoplasmique, par l'intermédiaire du domaine de liaison Ena/Vasp *homology 1* (EVH1) (Moeller et al., 2004 ; Tanoue & Takeichi, 2004). Fat1 est également localisée dans les sites avec un niveau élevée de *turnover* d'actine, comme les lamellipodes et les filopodes, et interagit avec Ena/Vasp dans ces structures (Moeller et al., 2004). Ainsi, Fat1 contribue à la régulation de la dynamique de l'actine en permettant l'échafaudage de Ena/Vasp et la transduction des signaux extracellulaires, favorisant la migration cellulaire (Moeller et al., 2004 ; Tanoue & Takeichi, 2004).

3.1.3 L'interaction Fat1-Fat4 dans le développement

Une étude s'est particulièrement intéressée aux rôles des cadhérines atypiques Fat1 et Fat4 dans le développement précoce du cortex. Cette étude a montré que le modèle de souris $Fat1^{KO}$ présente des exencéphalies, une malformation congénitale caractérisée par l'absence de fermeture du tube neural, entraînant une exposition du cerveau à

l'extérieur du crâne, ainsi qu'une augmentation de la taille de la zone ventriculaire (Badouel et al., 2015 ; Figure 44). Ces malformations sont également accompagnées d'une augmentation de la prolifération, quantifiée par une augmentation du marquage de la RGa ($Pax6^{+}$) et du nombre de cellules pendant la mitose et la phase G2 du cycle cellulaire ($Phh3^{+}$) (Badouel et al., 2015 ; Figure 44). Afin d'étudier le rôle de Fat1 dans les précurseurs radiaux, ils ont généré un modèle knockdown a été générée en inactivant *Fat1* par ARN interférents délivrés par IUE. L'inactivation de Fat1 conduit à une augmentation de la prolifération neuronale et à une localisation aberrante des cellules dans la IZ (Badouel et al., 2015 ; Figure 44).

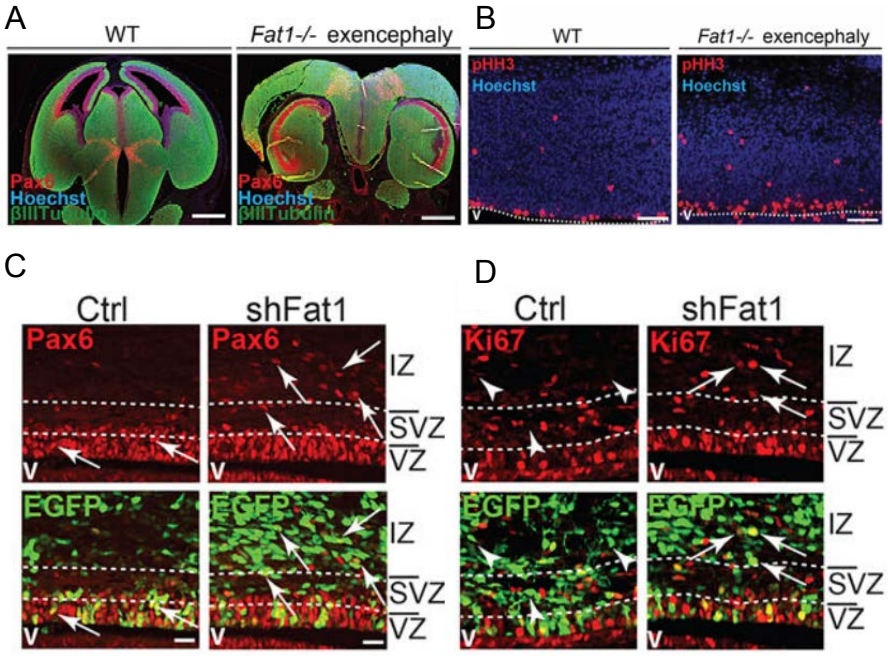


Figure 44. Impact de la délétion de *Fat1*. (A-B) Le modèle Fat1 KO présente des exencéphalies (A) ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules PAX6+ et PHH3+ (A-B). (C-D) L'inactivation de *Fat1* par ARN interférent induit une augmentation de la prolifération des RGa, se traduisant par une hausse du nombre de cellules de PAX6+ et de Ki67+, ainsi qu'une localisation aberrante de ces cellules dans la IZ (C-D). Adapté de *Badouel et al, 2015*

Chez le double KO $Fat1^{-/-}Fat4^{-/-}$ un phénotype d'exencéphalies plus sévère que celui du modèle simple KO *Fat1* est observé (Badouel et al., 2015 ; Saburi et al., 2012). L'inactivation simultanée de Fat1 et Fat4 par d'ARN interférents injectés par IUE montre également des phénotypes accentués par rapport à une inactivation de Fat1 uniquement. L'inactivation de Fat1 et Fat4 produit des effets additifs sur la prolifération des RGa, mais

joue également un rôle important dans le maintien de la constriction apicale (Badouel et al., 2015). Ces résultats suggèrent une interaction entre ces deux partenaires pour réguler ces processus. En effet, Fat1 a la capacité d'interagir avec Fat4 en formant des cis-hétérodimères (Badouel et al., 2015 ; Katoh, 2012). En raison de leurs grandes similitudes structurelles, de leurs domaines d'expressions chevauchant ainsi que de leurs rôles dans des voies de signalisation communes, ces deux cadhérines atypiques semblent jouer des rôles partagés (Figure 45). Cela suggère d'une possible redondance fonctionnelle entre ces deux cadhérines atypiques. De plus *Fat1/Fat4* coopèrent dans différents systèmes au cours du développement de la souris pour réguler l'allongement des tubules rénaux, l'extension cochléaire, la formation du tube neural crânial et la structuration des cellules ciliées externes dans la cochlée (Saburi et al., 2012). Il a également été démontré que des mutations sur Fat4 et Dchs1 étaient associées aux PVNH (Cappello et al., 2014). La mise en lumière d'une potentielle redondance fonctionnelle laisse penser que *Fat1* pourrait également être impliquée dans l'étiologie des PVNH.

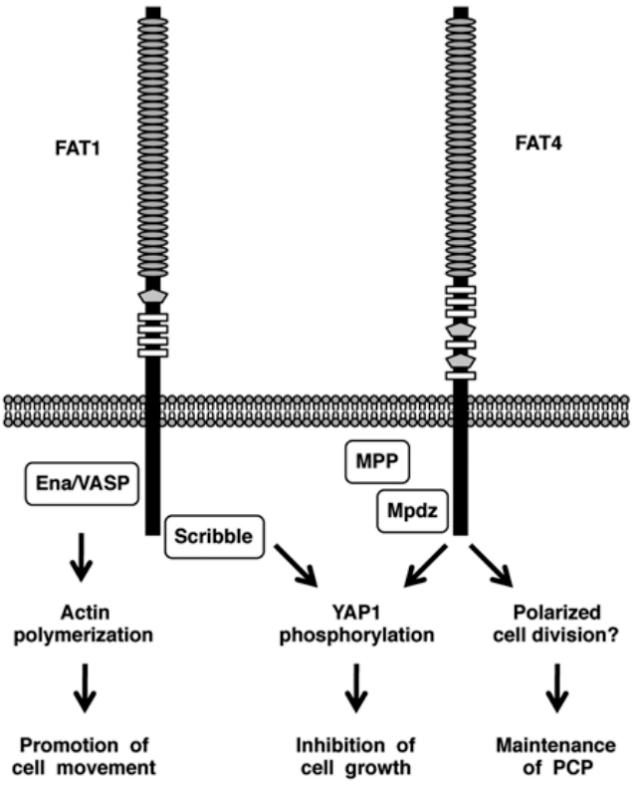


Figure 45. Les voies de signalisation et les partenaires de FAT1 et FAT4. *Katoh, 2012*

3.2 Pathologies associées des mutations du gène *FAT1*

Sur le plan clinique, *FAT1* est impliquée dans diverses pathologies. Son expression dans plusieurs tissus la relie à un large éventail de maladies, dont je ne vais décrire ici que quelques exemples. *FAT1* est associée à des cancers touchant plusieurs organes tels que des glioblastomes, des carcinomes, des mélanomes, des cancers colorectaux et des cancers de la tête et du cou, des cervicales (Morris et al., 2013 ; Sadeqzadeh et al., 2013 ; Peng & al., 2021). Dans de nombreux cas de tumeurs malignes, l'activation aberrante de la voie Wtn/β-caténine favorise la tumorogenèse par une augmentation de l'activité transcriptionnelle de la β-caténine (Lustig & Behrens, 2003). FAT1, également appelée *tumor suppressor*, est un régulateur de la voie de signalisation *Wnt* par sa capacité à lier la β-caténine empêchant sa translocation dans le noyau et régulant la prolifération (Morris et al., 2013 ; voir partie 3.1.1.2. La voie de signalisation Wtn/β-caténine). La perte de fonction de FAT1 est un événement fréquent durant l'oncogenèse ce qui entraîne une activation aberrante de la voie de signalisation Wtn /β-catenine (Morris et al., 2013). La délétion de *FAT1* favorise l'initiation et la progression des tumeurs malignes et stimule la transition épithéliale-mésenchymateuse via l'activation anormale de Sox2, un facteur de transcription responsable de l'auto-renouvellement cellulaire, et du complexe Yap/Taz (Pastushenko et al., 2021). Cette délétion affecte également la polarité cellulaire et l'adhérence des cellules tumorales avec la matrice extracellulaire (Pastueshenko et al., 2021). A l'inverse, certains cancers sont associés à une surexpression de *FAT1.* Dans certaines lignées cellulaires cancéreuses, il a été démontré que FAT1 est clivée, ce qui aboutit à un fragment lié à la membrane ainsi qu'une localisation altérée de FAT1 dans le cytoplasme et le noyau (Sadeqzadeh et al., 2011 ; Sadeqzadeh et al., 2013).

Des mutations faux-sens sur le gène *FAT1* ont été reportées chez des patients atteints de dystrophies musculaires facio-scapulo-humérale (FSHD) (Puppo et al., 2015). La FSHD est la troisième maladie neuromusculaire la plus fréquente et se caractérise par une faiblesse progressive des muscles faciaux, scapulaires et huméraux (Tawil et al., 2014). De plus, une majorité des patients présentant également des pertes d'audition dans 75% des cas, et dans environ 60% des cas des télangiectasies rétiniennes (Puppo et al., 2015 ; Tawil & al., 2014). Un cas de FSHD a déjà été reporté associé à du retard mental et de l'épilepsie (Saito et al., 2007). Chez la souris, *Fat1* module la polarité des myoblastes durant leur migration planaire ce qui permet de contrôler la morphogenèse des muscles dans les régions faciale et scapulo-humérale (Caruso et al., 2013). *Fat1* favorise la

croissance axonale et la spécification des neurones moteurs (Helmbacher, 2018). *Fat1* est également requis pour la coordination de la migration et la maturation des astrocytes dans la rétine, qui permet le développement de la vascularisation rétinienne (Helmbacher, 2022). De plus, la délétion de *Fat1* chez le modèle murin reproduit les différents aspects cliniques des FSHD (Caruso et al., 2013).

FAT1 est également impliquée dans plusieurs pathologies cérébrales, soulignant son rôle dans le développement cortical. En effet, *FAT1* serait un gène de susceptibilité associé aux troubles bipolaires (Abou Jamra et al., 2008 ; Blair et al., 2006). L'administration de doses thérapeutiques de lithium, une molécule utilisée dans le traitement de ces troubles, chez la souris entraîne une diminution de l'ARNm de *FAT1* et une augmentation de ses partenaires Ena et β-catenine (Blair et al., 2006). Ces résultats suggèrent que *FAT1* pourrait être impliquée dans des voies moléculaires associées à la susceptibilité des troubles bipolaires, bien que cela reste controversé dans la littérature (Light et al., 2007). Au vu des rôles des cadhérines dans le développement cortical, il est possible que *FAT1* puisse avoir un impact, même subtil, dans l'organisation des circuits corticaux (Aviles & Goodrich, 2017). De plus, une publication a mis en évidence une association entre quatre variants de gène différent, dont des variants sur le gène *FAT1*, dans des cas d'apparition précoce de troubles dépressifs majeurs (Grant et al., 2022).

FAT1 a également été lié aux troubles du spectres autistique (TSA) (Costa et al., 2021 ; Cukier et al., 2014 ; Frei et al., 2021 ; Hernando-Davalillo et al., 2022). Frei et al. ont démontré grâce à des cultures d'iPSC dérivées de patients TSA que l'expression de *FAT1* est diminuée par rapport aux contrôles (Frei et al., 2021). Des études sur la pathogénicité et la prévalence de certains gènes chez des patients TSA ont aussi associé *FAT1* à l'étiologie des TSA, confirmant ainsi l'importance des gènes de l'adhérence cellulaire dans ces troubles (Cukier et al., 2014 ; Costa et al., 2021). Pour finir, une patiente avec une duplication d'une région contenant le gène *FAT1* a été diagnostiquée comme atteinte de TSA (Hernando-Davalillo et al., 2021).

FAT1 a également été relié à des épilepsies. Une étude clinique récente a décrit plusieurs patients porteurs d'une mutation hétérozygote *compound* du gène *FAT1* souffrant d'épilepsie focale partielle et de crises tonico-cloniques généralisées peu fréquentes (Zou et al., 2024). De plus, 50 % de ces patients développent des crises fébriles à un âge précoce (Zou et al., 2024). Un cas précédent rapportait des mutations hétérozygotes *compound* faux-sens du gène *FAT1* chez un patient atteint

d'encéphalopathie développementale et épileptique, même si le rôle de *FAT1* dans l'étiologie reste non confirmé (Ware et al., 2019). Un autre patient, présentant des crises d'épilepsie, un retard psychomoteur sévère, ainsi que des pathologies multisystémique, a également été identifié avec des mutations hétérozygotes *compound* faux sens du gène *FAT1* (Fabretti et al., 2021). L'ensemble de ces publications suggère que *FAT1* pourrait être un gène impliqué dans l'épilepsie et les crises fébriles, bien que cette association reste incertaine en raison du nombre limité de cas décrits dans la littérature.

Pour conclure, bien que des rôles notables de *FAT1* aient été démontrés dans les étapes précoces du développement et dans diverses pathologies, y compris des pathologies cérébrales, son rôle dans la corticogenèse reste à ce jour inconnu. Comprendre son rôle dans l'établissement cortical permettrait non seulement de mieux comprendre les processus sous-jacents à ces pathologies, mais aussi de définir une nouvelle fonction de cette cadhérine atypique dans le développement cortical. Mes travaux de thèse ont donc porté sur l'étude du rôle de la cadhérine atypique FAT1 dans le développement, en particulier son implication dans les processus de migration neuronale et d'établissement des circuits corticaux.

OBJECTIFS

Comme décrit au cours de mon introduction la formation du cortex repose sur une succession d'étapes développementales permettant de générer le nombre approprié de neurones, leur positionnement au sein des couches corticales et leur maturation afin d'établir un réseau cortical fonctionnel. Ces événements sont particulièrement vulnérables aux mutations génétiques ou aux agressions environnementales, l'altération d'une des étapes du développement engendre des pathologies communément appelées malformations du développement cortical (MCD). Les PVNH représentent la forme la plus répandue de MCD. Sur le plan clinique les patients présentent des épilepsies de sévérité variable. Cependant, bien que les mécanismes conduisant à la présence de neurones ectopiques bordant le ventricule soient relativement bien compris, la physiopathologie sous-jacente à la genèse des crises d'épilepsies reste moins claire. En effet, la majorité des crises proviennent soit du cortex normotopique adjacent, soit de l'association cortex et des hétérotopies (crises normo-hétérotopiques). Cela suggère que les neurones intégrés dans le réseau cortical pourraient contribuer à la formation de circuit corticaux dysfonctionnels, et participer aux manifestations cliniques. Cependant, bien que les hétérotopies soient souvent le principal objet d'étude, les propriétés morpho-fonctionnelles des neurones déficients intégrés dans les réseaux corticaux demeurent méconnues. De plus, bien que les PVNH représentent la forme la plus fréquente de MCD et qu'une majorité des cas soit liée à des mutations du gène *FLNA*, un grand nombre de cas sporadiques ont une étiologie méconnue. Cela souligne l'importance d'identifier de nouveaux gènes potentiellement impliqués à l'origine des PVNH afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents à cette pathologie. La découverte de nouveaux gènes permettrait non seulement d'améliorer la compréhension des processus spécifiques menant à l'apparition des PVNH, mais aussi de révéler des mécanismes partagés avec d'autres MCD. La découverte de processus moléculaires et cellulaires communs pourrait offrir de nouvelles perspectives sur le fonctionnement global du développement cortical et de mieux la physiopathologie des PVNH.

Ainsi, au cours de mon doctorat, nous avons cherché à déterminer si les neurones déficients en *Flna* intégrés dans le réseau cortical pouvait contribuer à l'apparition de circuit corticaux dysfonctionnel. Le premier objectif de ma thèse a été d'investigué le rôle de *Flna* dans la maturation neuronale, en particulier dans l'établissement de l'arbre dendritique et des épines, ainsi que la distribution des entrées post-synaptiques

excitatrices et inhibitrices des neurones corticaux. Les neurones mutants qui s'intègrent dans les réseaux corticaux peuvent être à l'origine. Nous avons également cherché à comprendre par quels mécanismes moléculaires FLNA régulait ces processus. Ces résultats contribuent à une meilleure compréhension de la mise en place des réseaux corticaux dysfonctionnels sous-jacents à l'apparition des manifestations cliniques tel que l'épilepsie. L'ensemble de ces travaux sont décrit dans **l'Article 1**.

Dans un second temps, dans le cadre de nos études, nous avons pu accéder à un échantillon de tissu humain provenant d'un cas de PVNH bilatérale sévère associée à une ventriculomégalie, sans mutation dans les gènes connus pour être impliqués dans cette pathologie. Après une analyse par séquençage de l'exome entier et un protocole de sélection des variants, nous avons identifié des mutations hétérozygote *compound* dans le gène *FAT1*, décrit dans la **Partie II.1**. En revanche, le rôle de la cadhérine atypique FAT1 dans le développement cortical reste méconnu. Le second objectif de ma thèse a donc été d'investiguer le rôle de cette cadhérine atypique dans les différentes étapes de la corticogenèse. L'ensemble de ces travaux sont décrit dans l'**Article 2**. Dans la continuité de ces travaux de thèse, nous avons cherché à comprendre par quels mécanismes Fat1 régule la migration neuronale, ces travaux sont décrits dans la **Partie II.4 - Résultats préliminaires**.

En parallèle, mon équipe c'est intéressée l'intégration des interneurones au sein du cortex, médiée par des interactions entre les paires de Ligand-Récepteur (LR). Grâce à mon expertise acquise sur les électroporation *in utero* au sein de ma thèse, j'ai participé à cette étude dans le but d'étudier le rôle de la cadhérine 13 et de la protocadhérine 8 dans la régulation périsomatique de l'inhibition dans les couches profondes et superficielles, respectivement. Cette étude est décrite dans la partie **Annexe**.

L'ensemble de ces travaux mettent en évidence le rôle clé de certaines protéines dont Flna et de Fat1 dans les étapes clés du développement cortical et permettent une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à l'apparition des malformations corticales.

RESULTATS

PARTIE I

Partie I – Article 1

FLNA regulates neuronal maturation by modulating RAC1-cofilin activity in the developing cortex

Antonio Falace [a,**,1], Lea Corbieres [b,1], Catia Palminha [b], Fabrizia Claudia Guarnieri [c,d], Fabienne Schaller [b], Emmanuelle Buhler [b], Clara Tuccari di San Carlo [e], Aurelie Montheil [b,f], Françoise Watrin [b], Jean Bernard Manent [b], Alfonso Represa [b], Antoine de Chevigny [b], Emilie Pallesi-Pocachard [b,f], Carlos Cardoso [b,*]

[a] Pediatric Neurology and Muscular Diseases Unit, IRCCS Istituto “Giannina Gaslini", Genova, Italy

[b] INMED, INSERM UMR1249, Aix Marseille University, Parc Scientifique de Luminy, Marseille, France

[c] Institute of Neuroscience, National Research Council (CNR), Vedano al Lambro (MB), Italy

[d] IRCSS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy e Pediatric Neurology Unit and Laboratories, IRCCS Meyer Children’s Hospital University of Florence, Firenze, Italy

[f] INMED, INSERM UMR1249, Aix Marseille University, Molecular and Cellular Biology Platform, Parc Scientifique de Luminy, Marseille, France

[1] Equally contributing author.

* Corresponding authors.

Neurobiology of disease, Available online 7 June 2024

Problématique : Bien que les PVNH soient cliniquement associées avec de l'épilepsie, les mécanismes physiopathologies sous-jacents à la genèse des crises restent méconnus. De plus, la majorité des crises prennent place au sein du cortex normotopique ou de l'association normo-hétérotopiques, suggérant un dysfonctionnement des circuits corticaux établis. Toutefois, les processus de maturation et d'établissement des circuits corticaux en relation avec les PVNH restent largement inconnus. Afin de répondre à cette problématique, nous avons essayé de comprendre si les neurones déficients en FLNA étaient capables de s'intégrer correctement dans le réseau cortical. Nous avons également investigué les processus de maturation de ces neurones ainsi que les mécanismes moléculaires qui régulant ce processus.

Méthodes : Pour aborder cette problématique, nous avons déplétée *Flna* des neurones pyramidaux des couches II-III d'une souris conditionnelle $FLNA^{flx/flx}$ par injection de Cre recombinase à l'aide de la technique d'électroporation in utero.

Résultats principaux : Nous avons mis en avant que *Flna* régule les processus de dendritogenèse et de spinogenèse et contribue à maintenir un équilibre approprié entre les entrées excitatrices et inhibitrices des neurones corticaux. *Flna* module la dendritogenèse en régulant l'activité de RAC1 et la phosphorylation de la Cofiline via son interaction avec ARHGAP24. Ces résultats révèlent nouveau rôle de *Flna* dans la dendritogenèse et la spinogenèse qui sont des processus critiques à l'établissement d'une connectivité fonctionnelle adéquate. En comprenant comment *Flna* affecte ces processus, nous avons mis en lumière comment des réseaux corticaux aberrant peuvent se former, ce qui pourrait être liées à l'apparition ou à la genèse des crises d'épilepsie. Ces résultats contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques associés aux PVNH et à l'épilepsie, en soulignant l'importance de *Flna* dans la régulation de l'établissement des circuits corticaux.

J'ai activement contribué aux expériences portant sur les IUE pour l'investigation de la cofiline phosphorylée (mise au point et expérimentation), la gestion des animaux et la préparation des tissus pour les Western Blot. Les autres aspects du projet, ont été réalisés par d'autres membres de l'équipe.

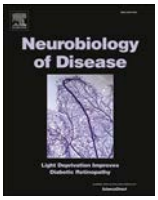
Neurobiology of Disease 198 (2024) 106558



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynbdi





FLNA regulates neuronal maturation by modulating RAC1-Cofilin activity in the developing cortex

Antonio Falace [a,**,1], Lea Corbieres [b,1], Catia Palminha [b], Fabrizia Claudia Guarnieri [c,d], Fabienne Schaller [b], Emmanuelle Buhler [b], Clara Tuccari di San Carlo [e], Aurelie Montheil [b,f], Françoise Watrin [b], Jean Bernard Manent [b], Alfonso Represa [b], Antoine de Chevigny [b], Emilie Pallesi-Pocachard [b,f], Carlos Cardoso [b,*]

[a] *Pediatric Neurology and Muscular Diseases Unit, IRCCS Istituto "Giannina Gaslini", Genova, Italy*
[b] *INMED, INSERM UMR1249, Aix Marseille University, Parc Scientifique de Luminy, Marseille, France*
[c] *Institute of Neuroscience, National Research Council (CNR), Vedano al Lambro (MB), Italy*
[d] *IRCSS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy*
[e] *Pediatric Neurology Unit and Laboratories, IRCCS Meyer Children's Hospital University of Florence, Firenze, Italy*
[f] *INMED, INSERM UMR1249, Aix Marseille University, Molecular and Cellular Biology Platform, Parc Scientifique de Luminy, Marseille, France*

ARTICLE INFO

Keywords:
Brain development
Neuronal maturation
Dendritogenesis -neurodevelopmental disorders
Animal model

SUMMARY

Periventricular nodular heterotopia (PNH), the most common brain malformation diagnosed in adulthood, is characterized by the presence of neuronal nodules along the ventricular walls. PNH is mainly associated with mutations in the *FLNA* gene – encoding an actin-binding protein - and patients often develop epilepsy. However, the molecular mechanisms underlying the neuronal failure still remain elusive. It has been hypothesized that dysfunctional cortical circuitry, rather than ectopic neurons, may explain the clinical manifestations. To address this issue, we depleted FLNA from cortical pyramidal neurons of a conditional *Flna*$^{flox/flox}$ mice by timed *in utero* electroporation of Cre recombinase. We found that FLNA regulates dendritogenesis and spinogenesis thus promoting an appropriate excitatory/inhibitory inputs balance. We demonstrated that FLNA modulates RAC1 and cofilin activity through its interaction with the Rho-GTPase Activating Protein 24 (ARHGAP24). Collectively, we disclose an uncharacterized role of FLNA and provide strong support for neural circuit dysfunction being a consequence of FLNA mutations.

Abbreviations: PNH, periventricular nodular heterotopia; FLNA, Filamin-A; RAC1, Rac Family Small GTPase 1; ARHGA24, Rho-GTPase Activating Protein 24; MCD, malformations of cortical development; Xq28, region q28 of the X Chromosome; flox, flanked by loxP; CAG, chicken beta-actin; CRE, Cre recombinase; LoxP, locus of crossover (x) P1; cKO, conditional knockout; CALNL, chicken actin loxP Neomycin loxP; GFP, Green fluorescent protein; IUE, *in utero* electroporation; E14.5, embryonic day 14.5; P6, postnatal day 6; NeuroD1, Neuronal Differentiation 1; ND1, NeuroD1; P15, postnatal day 15; DsRed, red fluorescent protein; FingR, recombinant fibronectin intrabodies generated by mRNA display; PSD, postsynaptic density; GTP, Guanosine-5′-triphosphate; ADF, actin depolymerizing factor; S3A, Serine3Alanine; T17N, Threonine17Asparagine; Q61L, Glutamine61Leucine; GAP, GTPase-activating protein; TSC, Tuberous Sclerosis Complex 1; MEK, Mitogen-activated protein kinase kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; Rheb, Ras homolog enriched in brain; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1; rpS6, ribosomal protein S6; mTOR, mechanistic target of rapamycin; PAC, P21 Activated Kinase 1; LIMK, LIM Domain Kinase 1; F-actin, filamentous actin; FMR1, Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1; Shank3B, SH3 And Multiple Ankyrin Repeat Domains 3B; FCD, focal cortical dysplasia; PTI-25, 1-benzyl-8-methyl-1,4,8-triazaspiro[4.5]decan-2-one (Simufilam); SEM, Standard error of the mean; Tbr1, T-Box Brain Transcription Factor 1; CDP, centromere binding factor; GST, Glutathione transferase; SDS-PAGE, Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; PBD, p21-binding domain; RIPA, radioimmunoprecipitation assay buffer; BCA, Bicinchoninic acid assay; ANOVA, analysis of variance..

* Corresponding author at: INMED, INSERM UMR1249, Parc Scientifique de Luminy, BP13, 13009 Marseille, France.
** Corresponding author at: IRCCS Istituto "Giannina Gaslini", Pediatric Neurology and Muscular Diseases Unit, Largo Gaslini 5, 16147 Genova, Italy.
E-mail addresses: antoniofalace@gaslini.org (A. Falace), carlos.cardoso@inserm.fr (C. Cardoso).
[1] Equally contributing authors.

https://doi.org/10.1016/j.nbd.2024.106558
Received 12 July 2023; Received in revised form 5 June 2024; Accepted 5 June 2024
Available online 7 June 2024
0969-9961/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The cerebral cortex plays key roles in learning, memory, sensory and motor functions (Kandel and Squire, 2000). The proper execution of these tasks depends on stereotypically organized and functional neural networks. Neural circuit connectivity is the endpoint of a long process of embryonic and postnatal cortical development, which relies on the generation and specification of a multitude of neuronal subtypes, their migration to appropriate layers and the establishment of synaptic connections between them (Ayala et al., 2007; Rakic, 2009; Kaas, 2013; Lodato and Arlotta, 2015). Alterations in any of these processes, due to genetic mutations or environmental insults (*e.g.* vascular injury, viral infection *in utero*), lead to malformations of cortical development (MCD). Although each individual MCD phenotype is considered rare, altogether MCDs represent a major cause of drug-resistant epilepsy, autism and intellectual disability (Guerrini and Dobyns, 2014; Guarnieri et al., 2018).

The most frequent form of MCD, Periventricular Nodular Heterotopia (PNH), is characterized by the presence of ectopic neuronal nodules lining the lateral ventricles. The majority of affected patients often have seizures and display average cognitive abilities despite the striking changes in grey matter architecture (Aghakhani et al., 2005; Parrini et al., 2006). Seizures occur most often in childhood, but the age of seizure onset varies from the neonatal period to adulthood (Parrini et al., 2006). The severity of seizures may range from mild, with rare episodes and spontaneous remission without need of antiepileptic drugs, to untreatable (Dubeau et al., 1995). Mutations in the *Filamin A* (or *FLNA*) gene on Xq28 are the main cause of PNH (Parrini et al., 2006; Fox et al., 1998). *FLNA* encodes a large (280 kDa) cytoplasmic dimeric actin-binding phospho-protein, which promotes cross-linking of F-actin filaments into orthogonal networks, thus tuning the elastic properties of the cytoskeleton (Gardel et al., 2006; Sutherland-Smith, 2011). The FLNA protein integrates extracellular signaling and cell adhesion with cytoskeletal organization, and mediates cell reshaping and migration predominantly through actin effectors such as the Rho-GTPases (Sutherland-Smith, 2011; Nakamura et al., 2009; Sheen, 2014). The expression of FLNA is widespread in developing cortex, particularly in radial glial cells, and persists in the adult brain in neuroependymal cells and in pyramidal neurons throughout layers II to VI (Sheen et al., 2002; Carabalona et al., 2012; Lian et al., 2012; Noam et al., 2012). In excitatory neurons, FLNA has been detected in the somato-dendritic compartment, including in dendritic spines (Noam et al., 2012; Segura et al., 2016). In rodents, complete *Flna* depletion results in embryonic lethality due to severe cardiovascular defects (Feng et al., 2006; Hart et al., 2006). In contrast, *in utero* knockdown of *Flna* in neural progenitors, leads to the formation of PNH lining the ventricular surface that results from disruption of both the polarized radial glial scaffold and the neuroepithelial lining (Carabalona et al., 2012). Interestingly, a similar phenotype was observed in brain biopsies from PNH patients carrying *a FLNA* mutation, which display clear discontinuity in the neuroepithelial lining (Carabalona et al., 2012; Ferland et al., 2009).

Although the link between PNH and clinical manifestations has been well established, the functional relationships between ectopic neurons and cortical structures remain uncertain. Indeed, no correlation between the extent of PNH and epilepsy severity was found (Parrini et al., 2006; Solé et al., 2009), and only a very little percentage of interictal epileptiform discharges are purely heterotopic in patients (6% of the cases) (Pizzo et al., 2017). Moreover, *FLNA* mutations in epileptic patients without PNH visible by brain imaging were reported (Wei et al., 2018; Hiromoto et al., 2020). These data support the hypothesis that cortical circuit dysfunction, rather than ectopic neurons, may explain the occurrence of seizures and cognitive impairment (Staley, 2015; Lee et al., 2017; Bozzi et al., 2018). However, the intrinsic role of FLNA in neural circuit formation and function still remains undetermined.

To address this issue, we deleted *Flna* from a fraction of layer II-III pyramidal neurons by timed *in utero* electroporation of Cre recombinase into developing *Flna*$^{flox/flox}$ mouse ventricular zone. Sparse depletion of *Flna* resulted in a marked increase in dendritic arborisation accompanied by modifications in spine morphology and distribution of mature excitatory synapses. We demonstrate that FLNA exerts its role in dendritogenesis by tuning RAC1 activation and cofilin phosphorylation through its interaction with the GTPase activating protein ARHGAP24 (also named as FilGAP). In fact, we show that overexpression of either the non-phosphorylable cofilin S3A mutant or the dominant-negative form of RAC1 or ARHGAP24 rescues the dendritic overgrowth induced by loss of *Flna***.** Overall, our findings demonstrate a cell-autonomous role for FLNA in dendritic morphogenesis and spinogenesis, which are critical processes in the establishment of functional neuronal connectivity, thus probably contributing to pathogenesis of FLNA-related PNH.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Breeding and experimental procedures were carried out in accordance with European guidelines (directive 86/609/EEC) for animal research and in accordance with French national institutional animal care guidelines (Authorization APAFIS#29902). *Flna*$^{flox/flox}$ (Flna$^{tm1.1Caw}$) and Nestin-Cre (B6.Cg-Tg(Nes-cre)1Kln/J) mice were obtained from Jackson Laboratories (Flna$^{tm1.1Caw}$: https://www.jax.org/strain/010907; Nestin-Cre: https://www.jax.org/strain/003771). The genetic background of both mice was C57BL/6. Mice were housed in ventilated, light-tight, sound-isolated chambers under standard 12:12 light/dark cycle (light on at 07.00 PM and light off at 07.00 AM) with food and water available *ad libitum*. The study was conducted in *Flna*$^{flox/flox}$ mice of both sexes unless otherwise specified.

2.2. In utero electoporation

Timed pregnant female *Flna*$^{flox/flox}$ mice at the E14 (E0 is counted as the morning on which the vaginal plug is detected) received buprenorphine (Buprecare, 0.045 mg/kg) and Carprofen (Rimadyl, 10 mg/kg) and were anaesthetized with sevoflurane (7.5% for induction and 3% for surgery). The uterine horns were exposed, and a lateral ventricle of each embryo was injected using pulled glass capillaries and a microinjector (PV 820 Pneumatic PicoPump; World Precision Instruments) with Fast Green (2 μg/ml; Sigma, USA) combined with the 1.5-3 μg of plasmid DNA constructs. Plasmids were further electroporated by delivering 30 V voltage pulses with a BTX ECM 830 electroporator (BTX Harvard Apparatus). The voltage was discharged in five electrical pulses at 950-ms intervals *via* 5-mm electrodes placed on the head of the embryo across the uterine wall.

2.3. Primary neuronal cultures and transfection

Primary cortical neurons were prepared from E18 brains of *Flna*$^{flox/flox}$ mice as previously described (Falace et al., 2014). Embryonic cortices were dissected and incubated in 0.125% trypsin (Gibco) for 25–30 min at 37 °C. Dissociated neurons were plated at low density (200 cells/mm^2), onto poly-L-lysine-coated 25 mm glass coverslips. Neurons were transfected with pCAG-GFP or pCAG-CRE and pCALNL-GFP at the day *in vitro* 3 by Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific). Neurons were fixed 3 days post-transfection with 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich) and 4% sucrose (Applichem) in 1× phosphate-buffered saline (PBS, Sigma Aldrich) at 37 °C for 15 min.

2.4. Expression constructs

ARHGAP24-full length; ARHGAPΔ648; RAC1T17N; RAC1-Q61L expression constructs were synthetised and cloned in the pCALNL-GFP using *Eco*RI and *Not*I restriction enzymes by Genescript (Piscataway, NJ). pEGFP-N1 human cofilin WT and pEGFP-N1 human cofilin S3A

were purchased from Addgene and subcloned into pCALNL-GFP constructs using EcoRI and NotI restriction enzymes. We performed Sanger sequencing of all constructs to confirm the correct insert orientation and validate their sequence.

2.5. Morphological analysis

2.5.1. Dendrites

Mice brains were perfused (P6 and P15) transcardially with Phosphate Buffered Saline (PBS), followed by 4% PFA and sliced at 100 μm on a vibratome (Microm). For morphometric analysis, images of GFP fluorescence were acquired on Olympus FluoView 300 confocal microscope. Images (50- to 70-μm-thick z-stacks) of isolated layer II/III pyramidal neurons and primary cortical neurons were acquired with a 40× oil-immersion objective, and *Z*-series were projected to 2D representations and used to sketch the neurite arbor. Quantification of dendritic length was performed after neuronal reconstructions with the ImageJ plug-in NeuronJ 1.2 software. A minimum of 65 neurons from at least 5 mice per condition were analysed and various parameters were evaluated and compared.

2.5.2. Spines

Flna$^{flox/flox}$ embryos were electroporated at E14.5 with either pCAG-EGFP or pCAG-Cre + pCALNL-GFP plasmids. Brains were collected at P15, sliced at 100 μm thickness with vibratome (Leica VT1000S) and imaged for GFP signal with confocal Olympus FluoviewFV500, 60× objective and 3× zoom factor (Z-stacks acquired at 1 μm step-size). Spine density and morphology of a secondary apical dendrites and a primary basal dendrite were analysed with the Neuronstudio 0.9.92 software (Rodriguez et al., 2008). Analyses were performed on maximal intensity projection images, not adjusted for brightness and contrast, and with default settings (X and Y voxel size set to 0.069 um). 5–10 images were analysed for each animal and mean spine densities and median morphological parameters were extrapolated.

2.5.3. Excitatory and inhibitory synapses

Imaging of P15 Flna$^{flox/flox}$ mice electoporated at E14.5 with FingR constructs (PSD95 or Gephyrin; 45) in combination either with pCALNL-dsRed and pCAG-CRE or pCAG-dsRed was done on Olympus FluoView 300 confocal microscope, 60× objective (Z-stacks acquired at 1 μm step-size). 40–80 cells from 5 pups for each condition were analysed for excitatory synapses; 50–109 cells from 5 to 6 pups for each condition were analysed for inhibitory synapses. Images were manually thresholded and PSD95 or Gephyrin puncta analysis was conducted in the selected dendritic region defined by dsRed fluorescence using ImageJ software.

2.6. Immunostaining

Electoporated P15 mice brains were perfused transcardially with Phosphate Buffered Saline (PBS), followed by 4% PFA and sliced at 100 μm on a vibratome (Microm). Slices were blocked at room temperature (RT) for 1 h with 5% normal goat serum and 0.3% Triton X-100 in PBS and incubated overnight at 37 °C with Tbr1 (Abcam; 1/4000), CDP (M-222 Santa Cruz Biotechnology; 1/200), Neu-N (Millipore; 1/300).

2.7. Active RAC1 pull-down assay

The activity of RAC1 was determined by the Active RAC1 Pull-Down and Detection Kit (Cytoskeleton, catalog no. BK035) according to the manufacture's procedure. The kit was used for the detection of RAC1 small GTPase activation through a GST-fusion protein containing the p21-binding domain (PBD) of human p21-activated protein kinase 1 (PAK1). Briefly, the total protein (at least 500 mg) extracted from cortical tissues of P15 *Flna*$^{Nestin\text{-}Cre+/y}$ hemizygote males and *Flna*$^{Nestin\text{-}Cre-/y}$ control males' tissues and an aliquot of the clarified supernatant was taken to test the total input of RAC1. The remainder was incubated with 10 μg GST-PAK1 PBD fusion protein bound to Glutathione-coupled agarose beads for 1 h at 4 °C. Subsequently, the beads were washed three times in cold Lysis Buffer, and bound proteins were eluted in 2× Laemmli reducing sample buffer. The eluted samples were heated for 5′, and then loaded onto SDS-PAGE gels for immunoblotting using mouse anti-RAC1 antibody (1:500; Cytoskeleton, #ARC03).

2.8. Western blot

Cortex tissues from mice were sonicated and lysed in RIPA buffer solution (Thermo Fisher Scientific) supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails (Thermo Fisher Scientific). The protein concentration was determined using the BCA assay (Thermo Fisher Scientific). Proteins (100 μg) were run on a polyacrylamide gel (Blot 4–12% Bis-Tris, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) and transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Science). Primary antibodies were incubated overnight at 4 °C and were as follows: alpha-tubulin (1:4000, Thermo Fisher Scientific, #62204); Cofilin (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, #sc376476); phospho-cofilin (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, #sc271921); S6 Ribosomal protein (1:500, Cell Signaling #2217), Phospho-S6 Ribosomal protein (1:500, Cell Signaling #2211) and Anti ADF/Destrin (1:1500, Thermo Fisher # PA1–24937). Signals were detected using substrate HR Immobilon Western reagent (MerckMillipore) and bands were analysed with ImageJ.

2.9. Statistical analysis

All statistical tests are described in the figure legends. Statistical methods to predetermine sample size were not used; sample sizes were estimated based on previous studies using the techniques described. Data are given as means ±SEM for *n* sample size. The normal distribution of experimental data was assessed using D'Agostino–Pearson's normality test. To compare two normally distributed sample groups, the two-tailed Student's *t*-test was used; otherwise, the Mann-Whitney's test was applied. To compare more than two normally distributed sample groups, one-way ANOVA, followed by Bonferroni's *post hoc* test, was used.

3. Results

3.1. FLNA regulates dendritic development of pyramidal neurons in vivo

To determine whether FLNA plays a specific role in dendritic complexity, we deleted *Flna* in a restricted population of neocortical neurons by timed *in utero* electroporation of Cre recombinase into developing conditional *Flna*$^{flox/flox}$ mouse ventricular zone (Fig. 1A). Ubiquitous Cre expression plasmid (CAG-Cre) was co-electroporated with the conditional loxP-STOP-loxP-GFP reporter plasmid (pCALNL-GFP) in neuroprogenitor cells by IUE at E14.5 to specifically target layer II-III pyramidal neurons. In this model, removal of conditional *Flna* allele (*Flna*^{cKO}) led to a migration delay in a highly restricted subset of developing neurons, whereas most of *Flna*^{cKO} neurons were correctly located in the cortical plate at E18 (Fig. S1). Such a defect was completely abolished when the Cre recombinase was expressed under the control of NeuroD1 promoter (*Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$), which allows the selective removal of *Flna* in postmitotic neurons only (Aprea et al., 2014), thus suggesting that loss of FLNA protein might be dispensable for proper neuronal locomotion (Fig. S1). At postnatal day 6 (P6), all electroporated *Flna*^{cKO} neurons reached the cortical layer II/III (Fig. S2), leading us to investigate more deeply the consequence of FLNA loss at single cell level at this stage. Interestingly, *Flna*^{cKO} pyramidal neurons displayed a marked increase in their dendritic outgrowth and branching when compared with control neurons expressing GFP only (CAG-GFP) (Fig. 1A-C). This increase involved particularly the arborisation of the basal component (Fig. 1B-C). A similar even more pronounced increase

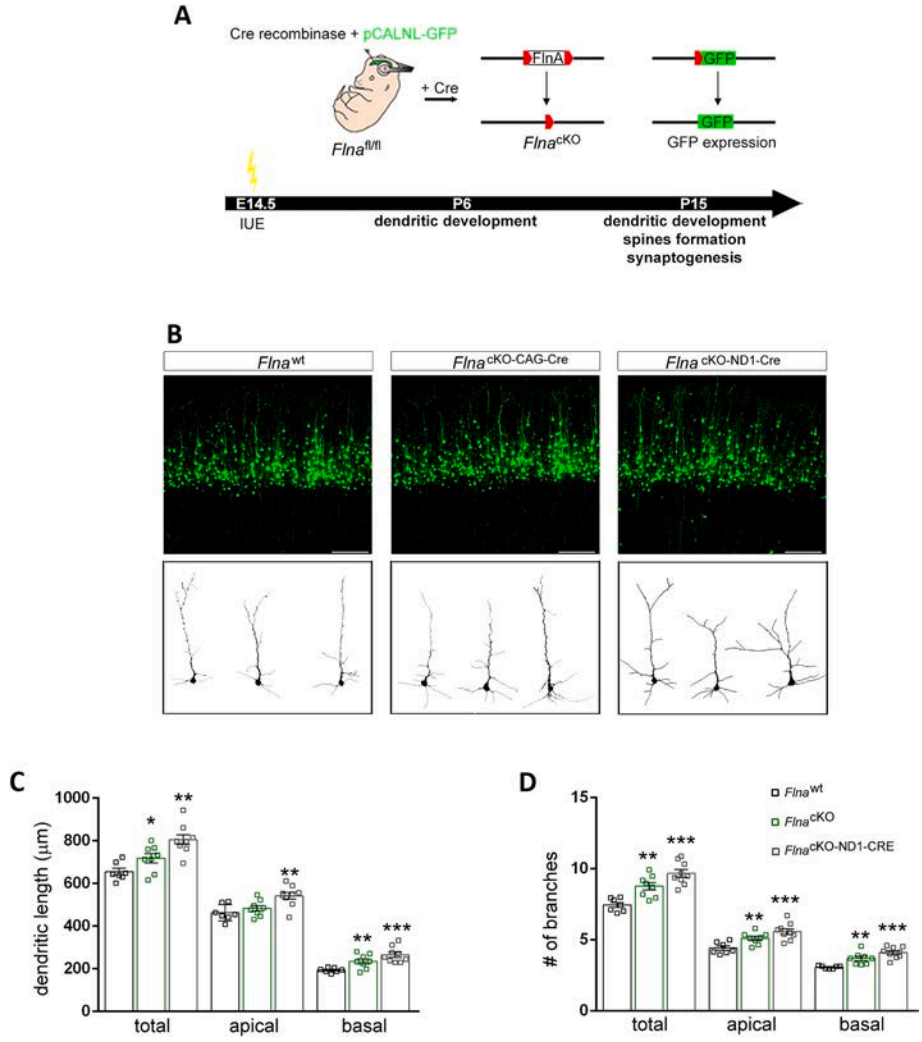


Fig. 1. Dendritic morphological analysis in P6 *Flna*^{cKO} neurons.
A) Schematic diagram of the experiments. Cre dependent removal of *Flna* was performed at E14.5 by IUE and properties of *Flna*^{cKO} neurons were analysed at postnatal stages P6 and P15. Concomitant GFP expression from pCALNL-GFP plasmid was used as Cre expression reporter. B) *Higher panels*, representative coronal sections of *Flna*$^{floxl/flox}$ P6 mouse brains electroporatedat E14.5 with GFP (*Flna*^{wt}) or pCALNL-GFP and pCAG-Cre (*Flna*^{cKO}) or NeuroD1-Cre (*Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$) (scale bar, 100 µm). *Lower panels*, representative reconstructed layers II/III pyramidal neurons showing dendritic arborization patterns from the same experimental conditions shown in a. C—D) Quantification of total dendrite outgrowth (C) and number of processes (D) separated into apical and basal dendrites ($n = 7$ for *Flna*^{wt}; 11–32 neurons were reconstructed for each animal; $n = 8$ for *Flna*^{cKO}, 17–39 neurons were reconstructed for each animal; $n = 9$ for *Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$, 12–30 neurons were reconstructed for each embryo). Data are means ±SEM and were compared *via* one-way ANOVA for repeated measures, followed by the Bonferroni's multiple comparison test. ***$P <$ 0.001, **$P < 0.01$, *$P < 0.05$ *vs* *Flna*^{wt}.

in dendritic outgrowth was observed upon expression of Cre under the control of NeuroD1 promoter (*Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$), which allows removal of *Flna* selectively in post-migrating neurons. Moreover, dendritic overgrowth was also observed in Cre-transfected *Flna*^{cKO} cortical cultured neurons (Fig. S3), further confirming the cell-autonomous function of FLNA in regulating dendritic complexity.

At P15, we found that dendritic overgrowth is an established feature of *Flna*^{cKO} neurons, clearly involving at this stage both apical and basal compartments (Fig. 2). In addition, *Flna*^{cKO} neurons displayed more developed primary basal processes with longer and supernumerary secondary branches (Fig. 2D-E**).**

3.2. Loss of FLNA affects dendritic spine distribution and morphology

Dynamic remodeling of the actin cytoskeleton provides the driving force behind structural alterations underlying dendritic spine formation and morphological maturation, a process tightly associated with synaptic strength, with larger spines – ranging from so-called mushroom to thin spines - representing stronger synapses, and short and wide immature spines (defined as "stubby") typically appearing during early synaptogenesis (de Curtis, 2008; Penzes et al., 2008; Costa et al., 2020). In addition, FLNA protein levels have been shown to be critical for dendritic spine regression associated with hypoxia *in vitro* (Segura et al., 2016). We wondered whether the loss of FLNA could affect the formation of dendritic spines *in vivo*. To address this question, we analysed dendritic spine density and morphology in apical and basal secondary dendritic branching of P15 *Flna*^{cKO} cortical pyramidal neurons by using GFP as a morphology and transfection marker. The analysis revealed that the density of the spines was significatively reduced in both apical and basal secondary branches in P15 *Flna*^{cKO} neurons compared to isochronic *Flna*^{wt} controls (Fig. 3A-C). Next, to determine whether loss of FLNA expression altered the distribution of spine type, we categorized spines into stubby, thin and mushroom, and determined the density, the length and the head diameter of each spine type per dendrite. We found that loss of FLNA strongly reduced the density of the mushroom spines in apical and basal dendrites whereas the density of stubby and thin spines

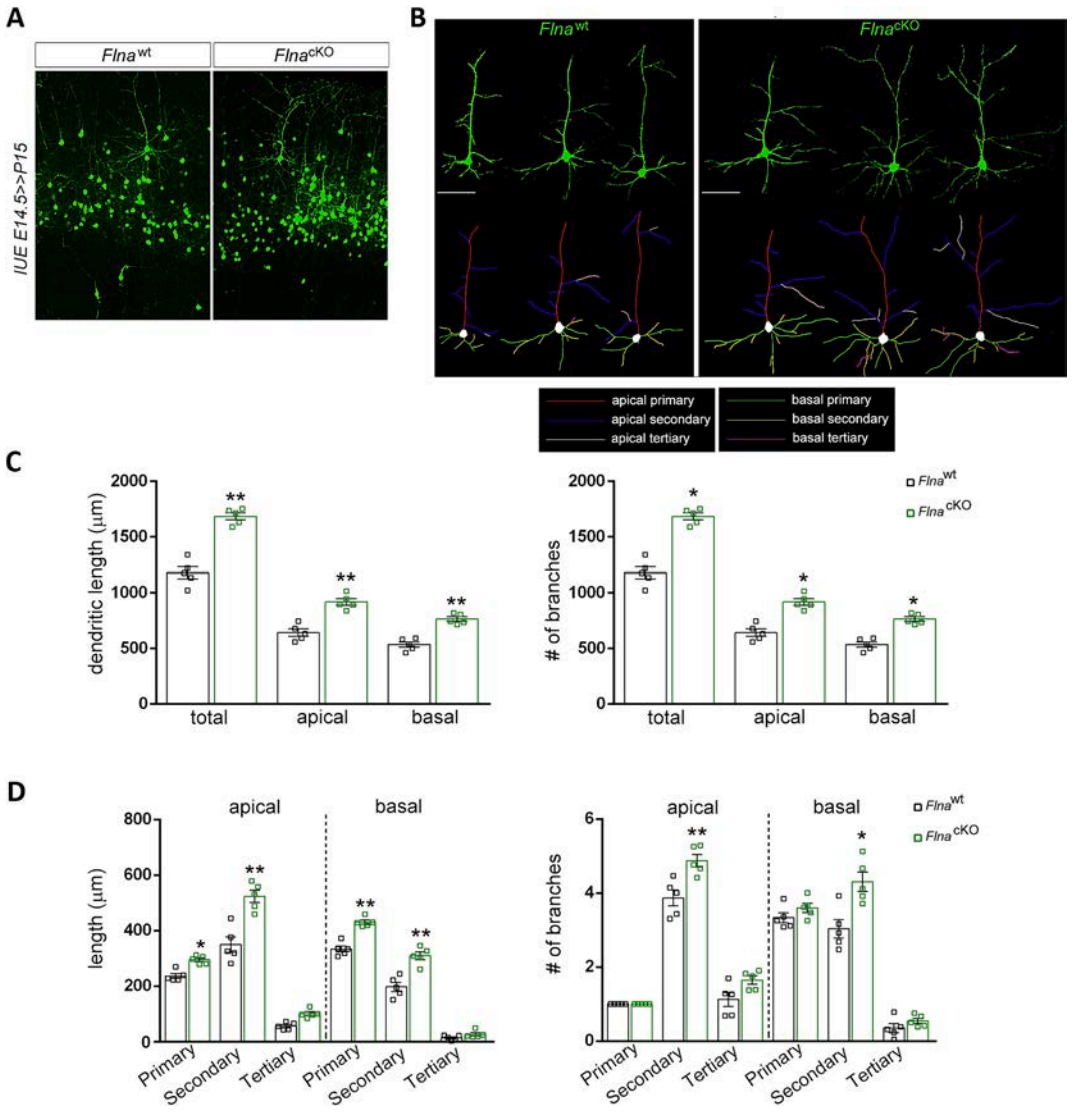


Fig. 2. *In vivo* morphological analysis of *Flna*^{cKO} cortical neurons at P15. A). Representative coronal sections of P15 mouse *Flna*$^{flox/flox}$ brains transfected by IUE at E14.5 with GFP (*Flna*^{wt}) or with pCALNL-GFP and pCAG-CRE (*Flna*^{cKO}) (scale bar, 100 µm). B) *higher panels*, high magnification images of layer 2/3 cortical neurons from the same experimental condition shown in b (scale bar, 50 µm). *Lower panels*, "skeleton outline" of basal and apical arbours, separated into primary, secondary, and tertiary branches, of neurons shown in B. C—D) Quantification of dendrite outgrowth length (left panels) and number of processes (right panels) separated into apical/basal, primary/secondary/tertiary order branches. *Flna*^{cKO} *in vivo* enhances both apical and basal arbours outgrowth, specifically driven by an increase in the complexity of primary and secondary order branches ($n = 5$ for *Flna*^{wt}, 13–23 reconstructed neurons for each animal; n = 5 for *Flna*^{cKO}, 12–21 reconstructed neurons for each animal). Data are means ±SEM and were analysed by unpaired two-tailed *t*-test (**P < 0.01, *P < 0.05).

was unaffected (Fig. 3D and G). The head diameter of apical stubby spines and – to a lesser extent – mushroom spines of *Flna*^{cKO} neurons were also decreased (Fig. 3E and H). Moreover, we observed that the spine length was barely reduced in mushroom type of apical dendrites as well as in thin spine type of basal dendrites (Fig. 3F and I). These data reveal that depletion of FLNA alters dendritic spine distribution and maturation along the dendritic arbours. Combined to the herein observed role of FLNA in dendritic outgrowth, these findings reveal the relevant role of FLNA in the dynamic processes that tightly coordinate morphological development and functional maturation of the cortical networks.

3.3. Unbalance between excitatory and inhibitory synapses in *Flna*^{cKO} neurons

In rodents' brains active synaptogenesis and synapse maturation peak around two weeks. At this developmental stage, neurons establish complex connectivity and form functional networks by balancing excitatory and inhibitory inputs. To investigate the role of FLNA in synaptogenesis, we assessed alterations of synapses *in vivo* using recombinant probes that allow the visualization of excitatory and inhibitory synapses formed by developing neurons (Gross et al., 2013). For this purpose, we electroporated E14.5 *Flna*^{cKO} embryos with pCALNL-dsRed and pCAG-CRE or pCAG-dsRed in combination with FingR-PSD95 or FingR-Gephyrin plasmids to label endogenous excitatory synapses and inhibitory contacts, respectively. Pyramidal neurons were then analysed at P15. At this stage, we found that the density of PSD95-positive excitatory contacts was reduced in both apical and basal compartments of the *Flna*^{cKO} neurons when compared to control neurons, accordingly and similarly to spine density reduction observed in isochronic *Flna*^{cKO} neurons (Fig. 4A-B). In contrast, the density of Gephyrin-positive inhibitory synaptic contacts in both apical and basal dendrites was not significantly different in *Flna*^{cKO} and control P15 neurons (Fig. 4C-D). These results unveil a prominent role of FLNA in excitatory synaptogenesis and suggest that loss of FLNA could finally lead to an unbalance between excitatory and inhibitory inputs in the

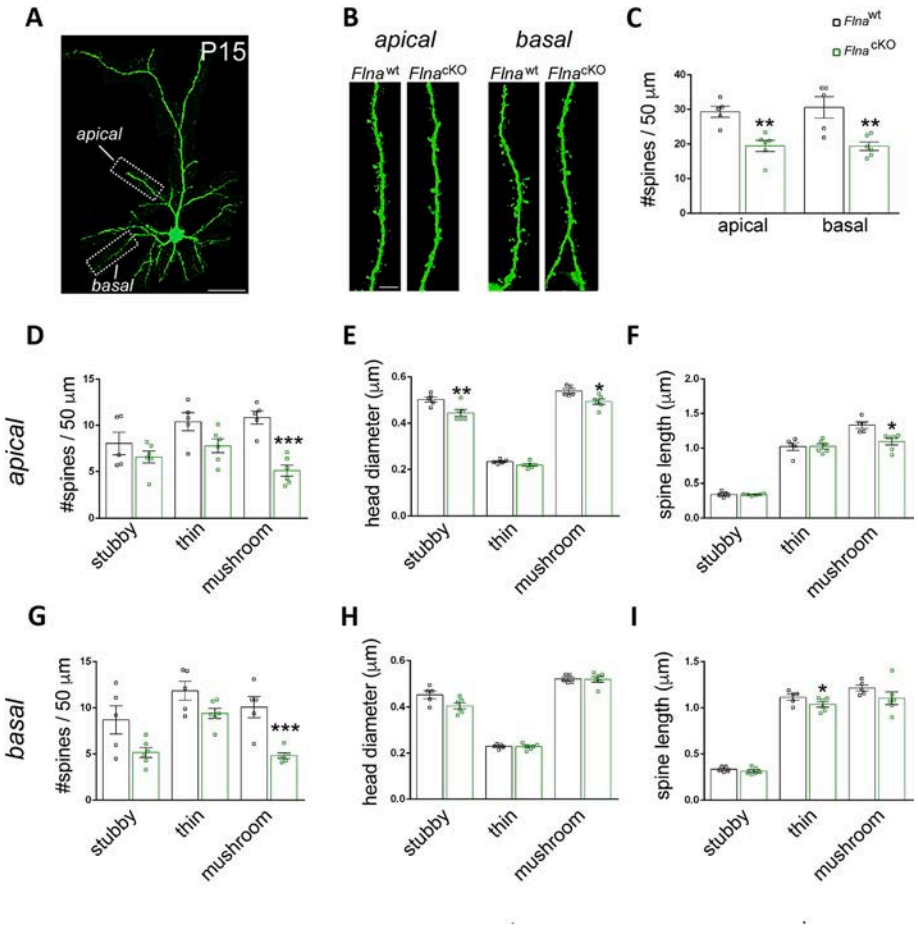


Fig. 3. Dendritic spines density and morphology alterations in *Flna*^{cKO} neurons. A) Representative image of a neuron electroporated at E14.5 and integrated in layer 2/3 of the somatosensory cortex at P15 (scale bar, 50 µm). Apical oblique and basal dendrites were selected for the analysis as indicated in dashed boxes. B) High-magnification images of apical oblique and basal dendritic segments of *Flna*^{wt} and *Flna*^{cKO} neurons (scale bar, 5 µm). C) Quantitative analysis of total spine density in apical oblique and basal dendrites in *Flna*^{wt} and *Flna*^{cKO} neurons (n = 5 for *Flna*^{wt}, *n* = 6 for *Flna*^{cKO}, 5–10 apical and basal dendrites for each animal). D and G) Quantitative analysis of stubby, thin and mushroom subset spine density in apical oblique and basal dendrites in *Flna*^{wt} and *Flna*^{cKO} neurons (n = 5 for *Flna*^{wt}, n = 6 for *Flna*^{cKO}, 5–10 apical and basal dendrites for each animal. E, F, H and I) Quantitative analysis of stubby, thin and mushroom morphological parameters (E and H head diameter; F and I spine length) in apical oblique and basal dendrites in *Flna*^{wt} and *Flna*^{cKO} neurons (n = 5 for *Flna*^{wt} n = 6 for *Flna*^{cKO}, 5–10 apical and basal dendrites for each animal. Data are expressed as mean ± SEM and were analysed by unpaired two-tailed t-test (***$p < 0.001$, **$p < 0.01$, *$p < 0.05$).

cortical network.

3.4. FLNA regulates dendritic growth by modulating cofilin activation

FLNA has been shown to modulate actin dynamics by regulating the function of the small GTPase RAC1 (Ohta et al., 2006), which coordinates several aspects of neuronal development including the establishment of neuronal polarity, neurite branching and synapse formation (de Curtis, 2008). Active GTP-bound RAC1 triggers a cascade resulting in the phosphorylation/inactivation of the actin-depolymerizing factor ADF/cofilin, thus leading to the stabilization of the actin cytoskeleton (Bokoch, 2003; Llano et al., 2015). Therefore, to assess whether cofilin activity dysregulation underlies the dendritic abnormalities observed in the *Flna*^{cKO} model we tested the levels of phosphorylated, inactive, cofilin (p-cofilin) in cortical brain tissues lacking *Flna*. For this purpose, we crossed the *Flna*^{cKO} female mice with a *Nestin*-Cre transgenic male mouse to drive selective *Flna* deletion in the central nervous system. Total levels of cofilin and p-cofilin were analysed by Western blot in *Flna*$^{Nestin\text{-}Cre+/y}$ hemizygote males and *Flna*$^{Nestin\text{-}Cre-/y}$ control males from the same litters. Total cofilin abundance did not differ significantly in *Flna*$^{Nestin\text{-}Cre+/y}$ mice *versus* controls, whereas phosphorylated cofilin was significatively increased in cortical lysates lacking *Flna* (Fig. 5A). Consistently, we assessed whether elevated cofilin phosphorylation may give rise to abnormal dendritic growth. For this purpose, we analysed the *in vivo* effect of constitutively active non-phosphorylatable form of cofilin (cofilinS3A) in *Flna* depleted neurons. As *in vivo* overexpression of CofilinS3A, under the CAG promoter, impairs neuronal migration (Chai et al., 2016; Fig. S4), we created a Cre-inducible CofilinS3A to express it by *in utero* electroporation selectively in postmitotic *Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$ neurons (Fig. S4). At P6, we found that overexpression of CofilinS3A mutant in *Flna* knockout neurons restored dendritic outgrowth and complexity to physiological levels (Fig. 5B-D). Taken together, these results suggest that FLNA may play a pivotal role in modulating cofilin activity to promote dendritogenesis.

3.5. FLNA modulates RAC1-cofilin activity through its interaction with ARHGAP24

Modulation of cofilin phosphorylation mainly relies on RAC1 activation, (Yang et al., 1998; Edwards et al., 1999), we therefore assessed the endogenous levels of GTP-bound (active) Rac1 in *Flna* knockout brains. We found that Rac1-GTP was increased in the cortex of *Flna*$^{Nestin\text{-}Cre+/y}$ hemizygote males relative to *Flna*$^{Nestin\text{-}Cre-/y}$ control males, with little or no detectable difference in total Rac1 abundance (Fig. S5). Next, we wondered whether lowering the levels of active RAC1 *in vivo* prevented the dendritic overgrowth observed in *Flna*^{cKO} neurons. To

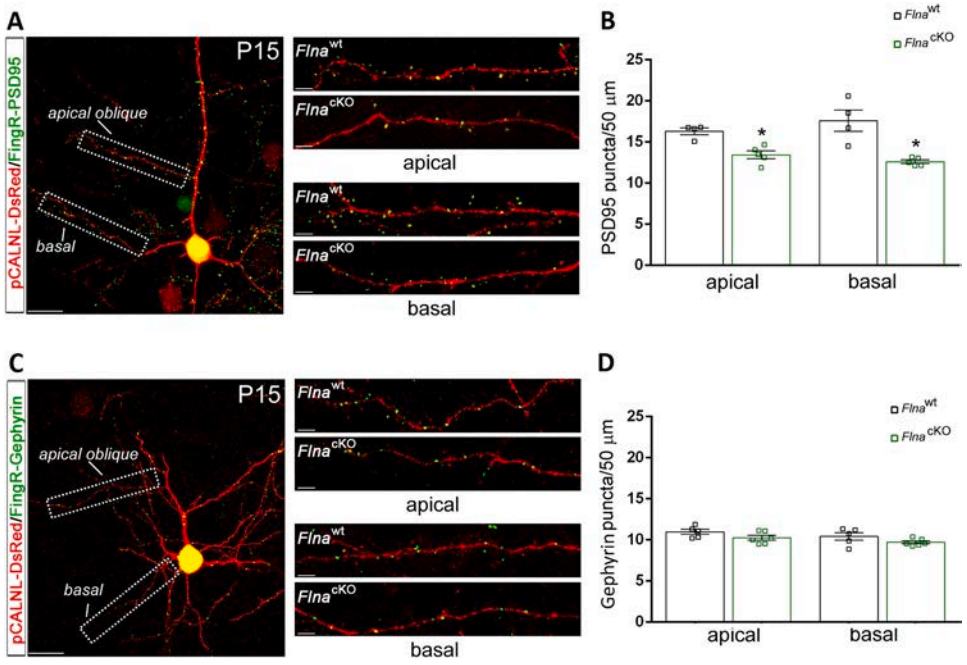


Fig. 4. Distribution of excitatory and inhibitory postsynaptic inputs in *Flna*^{cKO} cortical pyramidal neurons. A and C) Representative image of layer 2/3 *Flna*$^{flox/flox}$ neuron of the somatosensory cortex at P15 electroporated with pCAG-CRE, pCALNL-dsRed combined with FingR-PSD95 (A) or FingR-Gephyrin (C) constructs (scale bar, 80 µm). *Flna*$^{flox/flox}$ electroporated with pCAG-dsRed combined with FingR-PSD95 or FingR-Gephyrin constructs were used as controls. High-magnification images on apical and basal dendritic tracts of *Flna*^{wt} and *Flna*^{cKO} P15 cortical neurons were shown on the right (scale bar, 5 µm). B and D) Quantitative analysis of the PSD95 (B) or Gephyrin (D) puncta density in apical and basal dendritic compartments. Individual data and means ±SEM are shown. (PSD95: 40–51 apical and basal dendrites from 4 animals for *Flna*^{wt}; 68–80 apical and basal dendrites from 5 animals for *Flna*^{cKO}. Gephyrin: 50–66 apical and basal dendrites from 5 animals for *Flna*^{wt}; 65–109 apical and basal dendrites from 6 animals for *Flna*^{cKO}; *P < 0.05 unpaired two-tailed t-test).

directly test this issue, we altered *in vivo* the activity of RAC1 in *Flna* depleted neurons by overexpressing the RAC1-GDP inactive form (RAC1-T17N) (Fig. 6A) (Chai et al., 2016). As RAC1 dysfunction has been reported to disrupt neuronal migration (Tahirovic et al., 2010) (Fig. S6), henceforth experiments were performed in *Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$ neurons. We found that *Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$ cells overexpressing the constitutively inactive RAC1-T17N displayed a significant reduction in the size and number of both apical and basal dendrites when compared to *Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$ neurons (Fig. 6B-D). In contrast, the overexpression of the constitutively active RAC1 (RAC1Q61L) enhanced dendritic overgrowth of *Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$ neurons (Fig. S7), suggesting that FLNA protein controls cofilin phosphorylation by regulating levels of active RAC1 *in vivo*. In non-neuronal cells, FLNA interacts with ARHGAP24 (or FilGAP), a RAC1-GTPase-activating protein (GAP) and targets it to sites of membrane protrusion where it inactivates RAC1 signaling (Ohta et al., 2006) (Fig. 6A). In addition, it has been shown that ARHGAP24 decreased neurite outgrowth in cultured neurons (Nguyen et al., 2012). Accordingly, overexpression of ARHGAP24 in the developing cortex by IUE decreased neuronal dendritic outgrowth *in vivo* when compared to control isochronic neurons (Fig. S8). In contrast electroporation of the ARHGAP24Δ648 truncated form lacking the FLNA binding domain (14, 36) did not impair dendritic outgrowth further suggesting that ARHGAP24 exerts its role on RAC1-GTP levels by interacting with the FLNA protein.

Therefore, we wondered whether lowering the levels of active RAC1 *in vivo* through ARHGAP24 overexpression prevented the dendritic overgrowth observed in *Flna* depleted neurons. Remarkably, in P6 *Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$ neurons overexpressing ARHGAP24, the length and arborization of apical and basal dendrites were strikingly reduced compared to *Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$ neurons and did not significantly differ from isochronic *Flna*^{wt} neurons (Fig. 6B-D), suggesting the FLNA/ARHGAP24 binding is needed to maintain physiological levels of active RAC1 and, therefore, for a proper dendritogenesis in cortical neurons.

4. Discussion

In this study we demonstrated that loss of FLNA protein in developing cortical neurons resulted in a marked overgrowth of the dendritic tree accompanied by a profound reorganization of dendritic spines and synaptic contacts.

A proper dendritic growth is critical for neuronal function, as the size and shape of the dendritic arborization define the neuron's receptive field that is crucial for its functional connectivity. According to this, abnormal dendritic complexity is a shared feature of many neurodevelopmental disorders associated with neurological defects (Jan and Jan, 2010; Nestor and Hoffman, 2012; Nelson and Bender, 2021). *In vivo* cell autonomous FLNA depletion resulted in a hypertrophic dendritic tree in mouse cortical neurons compared to cells expressing normal FLNA protein levels. Such a defect was already visible in the first postnatal stages of the dendritic development and became more evident at P15, suggesting that dendritic overgrowth is a feature of *Flna*^{cKO} neurons. Removal of *Flna* in cortical cultured neurons also promoted neurite overgrowth confirming the cell autonomous role for FLNA protein in neuronal dendritogenesis. Expression of FLNA protein peaks around birth in rodents' brains (Sheen et al., 2002; Carabalona et al., 2012) but is maintained at postnatal stages when morpho-functional maturation of cortical neurons occurs (Noam et al., 2012), further suggesting a neurobiological role of FLNA in later neuronal development.

It has been shown in wild-type olfactory bulb granule cells that both under- and over-expression of FLNA protein led to more complex dendritic arborization *in vivo* (Zhang et al., 2014). Increased FLNA levels in the *Tsc1*^{null} mice due to MEK-ERK1/2 hyperactivation led to dendritic overgrowth and restoring appropriate levels of FLNA normalized dendritic growth and synaptic activity (Zhang et al., 2014). The TSC complex represses the Ras homolog enriched in brain (Rheb) activity, the canonical activator of mTOR complex1 (mTORC1). Thus, *Tsc1*-loss leads to hyperactive mTORC1 and consequent phosphorylation of rpS6 in

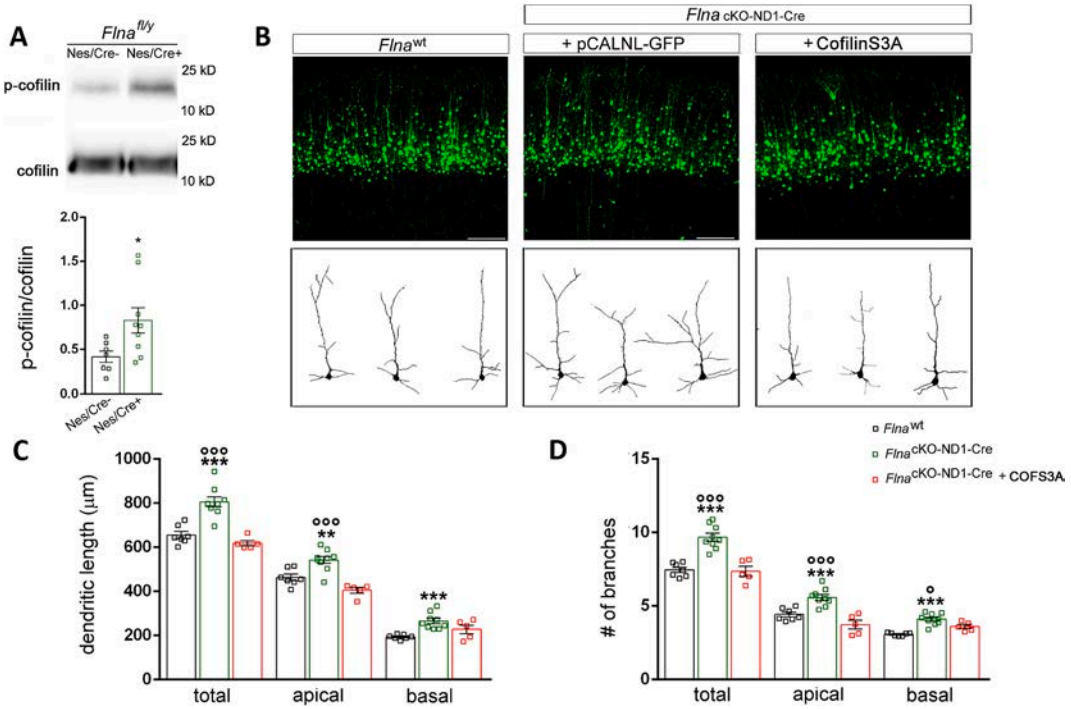


Fig. 5. Dysregualtion of Cofilin phosphorylation underlies dendritic overgrowth in Flna$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$ cortical neurons. A) Representative western blot (top) and summary data (bottom) assessing the abundance of phosphorylated (p-) and total cofilin in brain lysates from P15 cortex of *Flna*$^{Nestin\text{-}Cre+/y}$ hemizygote males (Nes/Cre+) and *Flna*$^{Nestin\text{-}Cre-/y}$ control males (Nes/Cre-). Data are means ±SEM and were analysed by paired two-tailed *t*-test. *$P < 0.05$. *Flna*$^{Nestin\text{-}Cre-/y}$ n = 7; *Flna*$^{Nestin\text{-}Cre+/y}$ $n = 9$. B) *Higher panels*, representative coronal sections of P6 *Flna*$^{flox/flox}$ mouse brains electoporated at E14.5 with GFP (*Flna*^{wt}) or pCALNL-GFP + NeuroD1-CRE (*Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$) alone (pCALNL-GFP) or in combination with pCALNL-CofilinS3A (CofilinS3A) (scale bar, 100 µm). *Lower panels*, representative reconstructed layers II/III pyramidal neurons showing dendritic arborization patterns from the same experimental conditions shown above. C—D) Quantification of total dendritic outgrowth (C) and number of processes (D) separated into apical and basal dendrites (n = 7 for *Flna*^{wt}; 11–32 neurons were reconstructed for each animal;n = 9 for *Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$, 12–30 reconstructed neurons for each animal; n = 6 for *Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$ + Cofilin S3A, 6–9 reconstructed neurons for each animal). Data are means ±SEM were compared *via* one-way ANOVA for repeated measures, followed by the Bonferroni's multiple comparison test (***P < 0.001, **P < 0.01, *vs* *Flna*^{wt}; ◦◦◦P < 0.001, ◦P < 0.05 *vs* *Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$; *Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$ + Cofilin S3A).

neurons (Zhang et al., 2014; Zhang et al., 2020). In *Flna*$^{Nestin\text{-}Cre+/y}$ mouse model cortical levels of phosphorylated rpS6 did not differ compared to control samples suggesting that FLNA acts downstream of the mTOR pathway (Fig. S9). Thus, modulation of FLNA activity could represent an ideal end target for the regulation of actin dynamics through RAC1-to-cofilin and different convergent pathways could impinge on FLNA.

Previous findings suggested a role for FLNA protein at synaptic sites (Segura et al., 2016; Jobin et al., 2023). Accordingly, we reported that FLNA loss affects dendritic spine distribution and morphological maturation in cortical *Flna*^{cKO} neurons that migrate normally in normotopic cortex, and which represent the majority (90%) of *Flna* deficient neurons. This defect was accompanied by a concomitant decrease in the excitatory synaptic contacts established by *Flna*^{cKO} neurons whereas inhibitory synapse distribution was unchanged. Notably, putative total spines number *per* cell is not significatively changed in *Flna*^{cKO} neurons compared to control neurons (Fig. S10). Spine density reduction in secondary branches of *Flna*^{cKO} neurons could be either attributable to a direct role of FLNA in dendritic spine formation and stabilization, or it might represent an active feedback mechanism by which *Flna*^{cKO} neurons eventually compensate for dendritic overgrowth. Further studies are needed to assess the global consequences of FLNA-related defects on neuronal excitability and synaptic transmission in *Flna*^{cKO} neuronal circuits.

Our data demonstrate that the increased neuronal complexity in *Flna*^{cKO} excitatory cortical neurons reflects a dysregulation of the activity of the RAC1 GTPase, a key determinant in actin dynamics. In non-neuronal cells, ARHGAP24 GAP activity on RAC1 is modulated by phosphorylation and by binding to FLNA, which ultimately impacts the phosphorylation state of the actin severing enzyme cofilin (Ohta et al., 2006; Nakamura, 2013). The fine tuning of RAC1 is essential to determine the rate and size of dendritic outgrowth (de Curtis, 2008). Accordingly, the expression of a dominant-negative RAC1 in wild-type cortical neurons caused a marked reduction in the number of primary dendrites. Conversely, the expression of constitutively active RAC1 led to an increase in the number of primary and basal dendrites *in vitro* (de Curtis, 2008; Threadgill et al., 1997). These new results are consistent with the observation that the genetic deletion of RAC1 regulatory proteins results in neuritogenesis alterations and hyperphosphorylation of cofilin accompanied by dysregulation of PAK-LIMK pathway (Xiang et al., 2016; Zamboni et al., 2018). Accordingly, the expression of constitutively non-phosphorilable cofilin restores physiological levels of dendritic outgrowth in *Flna* depleted neurons and further corroborated the relevance of a FLNA-RAC1-Cofilin regulatory axis in dendritogenesis.

In this study, we showed that FLNA modulates ARHGAP24 activity on RAC1 in cortical neurons *in vivo*. Overexpression of ARHGAP24 or of the dominant-negative form of RAC1 rescues the dendritic overgrowth induced by embryonic loss of *Flna* gene. *In utero* overexpression of ARHGAP24 alone in a wild-type cerebral cortex also resulted in abnormal dendritic outgrowth whereas removal of FLNA-binding domain (ARHGAP24Δ648) prevented this phenotype, thus demonstrating that FLNA represents an upstream modulator of ARHGAP24-RAC1-cofilin pathway. However, we cannot exclude that FLNA may modulates cofilin activity also through mechanisms alternative to RAC1. Indeed, the interplay between RhoA and RAC1 is a major determinant of cofilin activation through PAK1. It has been shown that FLNA interact with RhoA in brain tissues (Lian et al., 2019), but the impact of FLNA-

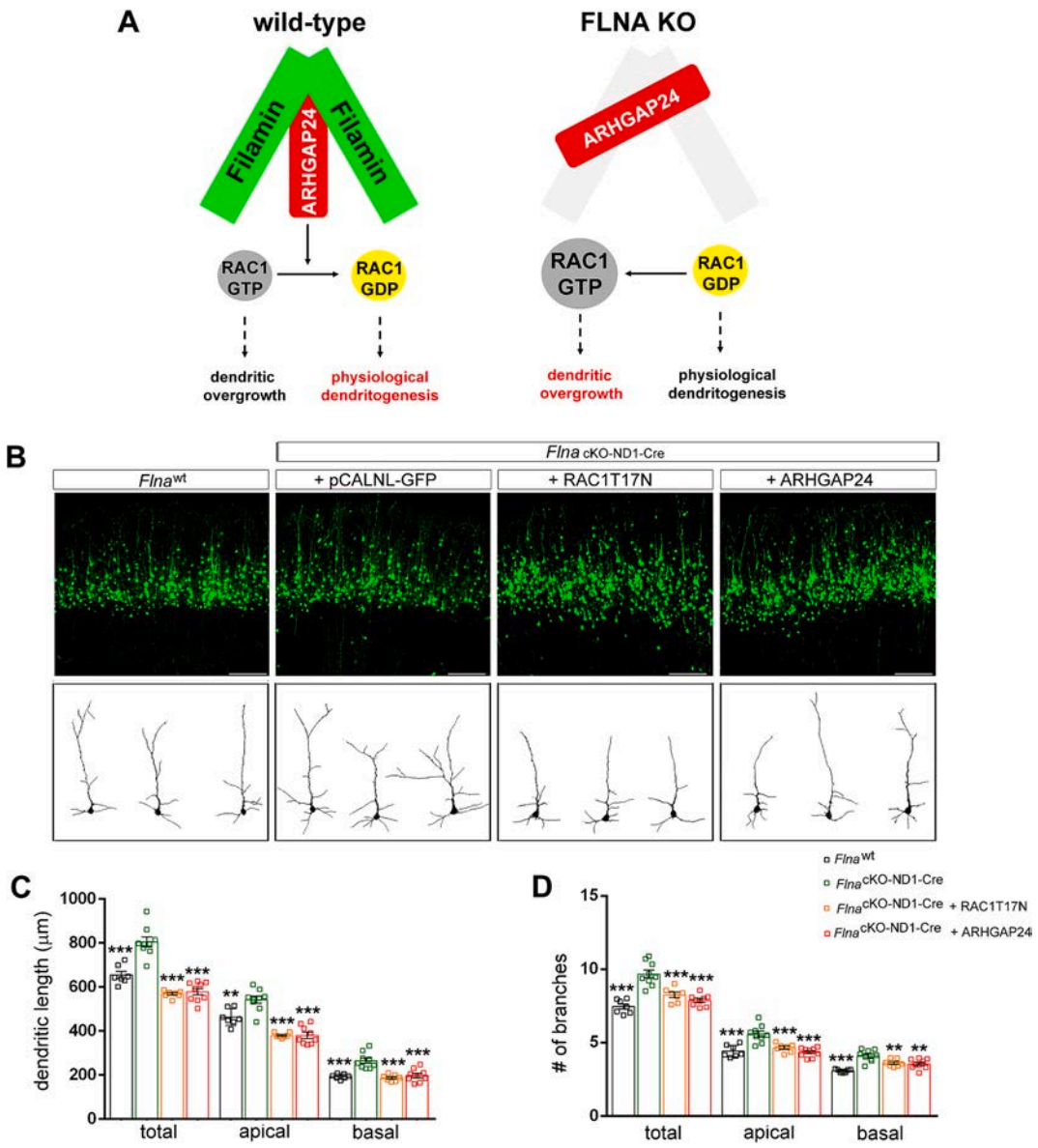


Fig. 6. *In vivo* lowering of RAC1-GTP or overexpression of ARHGAP24 in *Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$ neurons prevents dendritic overgrowth. A) Schematic diagram of the FLNA/ARHGAP24/RAC1 functional interaction. FLNA binding targets ARHGAP24 to sites of membrane protrusion, where it antagonizes RAC1, a small GTPase that cycles between inactive GDP-bound and active GTP-bound forms. ARHGAP24 accelerates GTP hydrolysis, thereby inactivating RAC1. B) *Higher panels*, representative coronal sections of P6 *Flna*$^{flox/flox}$ mouse brains electoporated at E14.5 with GFP (*Flna*^{wt}) or pCALNL-GFP + NeuroD1-CRE (*Flna*^{cKO}) alone or in combination with pCALNL-RAC1T17N (*Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$ + RAC1T17N) or pCALNL-ARHGAP24 (*Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$ + ARHGAP24) (scale bar, 100 µm). *Lower panels*, representative reconstructed layers II/III pyramidal neurons showing dendritic arborization patterns from the same experimental conditions shown above. C, D) Quantification of total dendritic outgrowth (C) and number of processes (D) separated into apical and basal dendrites (n = 7 for *Flna*^{wt}; 11–32 neurons were reconstructed for each animal;n = 9 for *Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$, 12–30 reconstructed neurons for each animal; n = 7 for *Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$ + RAC1T17N, 18–28 reconstructed neurons for each animal; n = 9 for Flna$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$ + ARHGAP24,17–27 reconstructed neurons for each animal). Data are means ±SEM were compared *via* one-way ANOVA for repeated measures (***P < 0.001, **P < 0.01, * *Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$).

RHOA in cofilin activity has not been investigated. Ours rescue experiments on dendritogeneiss using constitutively inactive RAC1 or ARHGAP24, which displays a specific GAP activity toward RAC1, support a pivotal role of FLNA-RAC1 complex on cofinlin activity.

Actin is the most abundant cytoskeletal protein in dendritic spines (Cingolani and Goda, 2008; Hotulainen and Hoogenraad, 2010), and modulation of actin polymerization/depolymerization balance determines spine morphogenesis, synaptogenesis and synaptic plasticity (Minegishi et al., 2023). The actin-depolymerizing enzymes of the ADF/cofilin family represents the endpoint factor that regulates dendritic spine dynamics, as severing of F-actin allows spine maturation. Upon phosphorylation mediated by PAK1 on specific residues (Bamburg et al., 2021), cofilin turns into an inactive state leading to actin stabilization. Increased levels of cofilin phosphorylation in *Flna*$^{Nestin\text{-}Cre+/y}$ cortices indicate that p-cofilin/cofilin unbalance contribute to synaptic defects identified in the *Flna*^{cKO} model (schematic diagram of the proposed molecular mechanism is shown in Fig. S11). In addition, in *Flna* knockout cortex total levels of ADF were unchanged (Fig. S12), suggesting that increased cofilin phosphorylation may be not functionally compensated. Cofilin inactivation has been extensively shown to enhance spine maturation and stabilization (Bamburg et al., 2021; Rust, 2015). In *Flna* depleted cells dendritic hypertrophy was accompanied by cofilin inactivation and altered distribution of spines. In addition, we found a reduction of the relative frequency of mushroom spines but no

changes in their putative total number (Fig. 3 and Fig. S10). A possible explanation for this discrepancy may engage the intrinsic role of FLNA on actin stability at spines. The spine head contains a dense network of branched F-actin filaments, which decrease in density toward the head-neck junction (Korobova and Svitkina, 2010; Bär et al., 2016). As FLNA is an essential F-actin-crosslinking protein, loss of *Flna* may hinder the formation of F-actin network at the spine head thus preventing the formation of mature mushroom spines. Indeed, tight regulation of FLNA levels is required for the proper dendritic spine formation *in vitro* (Segura et al., 2016), but the molecular mechanism remains unknown. Our findings indicate that loss of FLNA at the dendritic spines could hinder spine maturation independently from cofilin phosphorilation, suggesting a dual role of the FLNA-Cofilin interplay on actin network remodeling either at the dendrites and/or at spines. Additional studies at earlier and later developmental stages are required to provide a clearer picture on the FLNA function in spines development and function. Ideally, such analysis should combine live imaging of spines dynamics with single-cell electrophysiological recordings, which represents an essential readout to determine the maturation rate of dendritic spines.

It is important to note that altered RAC1 activity in excitatory and inhibitory brain circuits results in excitability unbalance (Hotulainen and Hoogenraad, 2010), and dysfunctions in RAC1-to-cofilin signaling have been related to several brain diseases ranging from early-onset developmental disorders, psychiatric conditions (major depressive disorder) to neurodegenerative disorders. For instance, stress-induced decreases in RAC1 expression have been shown to impair spines maturation by promoting the selective increase of cofilin-positive immature stubby spines (Golden et al., 2013). Interestingly, restoring appropriate levels of RAC1-to-cofilin signaling represents a potential therapeutic option. Indeed, correction of aberrantly increased RAC1 activity corrects aberrant spine defects in the somatosensory cortex of the X-fragile mouse model (*Fmr1* KO) (Pyronneau et al., 2017) and rescues the social deficits in the *Shank3B* knockout mouse model of autism (Ma et al., 2022). *De novo* mutations in RAC1 have been identified in variable combinations of developmental delay, intellectual disability and brain anomalies such as polymicrogyria (Reijnders et al., 2017; Banka et al., 2022). However, the direct contribution of downstream effects of RAC1 dysregulation on cofilin function has not been investigated in these patients.

Neuropsychiatric presentations are an often-underestimated consequence of *FLNA*-patients (Fry et al., 2013) and *de novo* variants in *FLNA* associated with autism have been found (Wegiel et al., 2010; Gilman et al., 2011).

Morpho-functional maturation abnormalities associated with FLNA-loss in cortical pyramidal neurons strongly support the idea that a wide and extensive neural circuit dysfunction underlies *FLNA* mutations. Our findings corroborate the hypothesis that heterotopic nodules could represent a hallmark of a more global cortical network dysfunction in patients. Grey matter heterotopia may reflect early-stage dysfunction on neurodevelopmental steps whose real extent become evident later on cortical excitability. Accordingly, *FLNA*-patients develop seizures regardless of PNH presence (Wei et al., 2018; Hiromoto et al., 2020). In the *in utero Flna*-model we can appreciate transient and embryonic restricted neuronal migration defects. Such phenotype, which involved a low fraction of migrating neurons, was even less evident at postnatal stages. Interestingly, selective removal of *Flna* in postmitotic neurons did not affect cortical migration. Electrophysiological studies on CAG-CRE *versus* NeuroD1-CRE electoporated $Flna^{cKO}$ neurons will rule out whether the initial migration delay impacts on cortical network function or not. However, the absence of ectopic nodules also in the two *Flna* knockout mice strains that have been developed so far (Feng et al., 2006; Hart et al., 2006), suggest caution in considering the mouse brain lacking *Flna* as a faultless model for the study of the FLNA role in the human brain.

Epileptic seizures represent the most common neurological manifestation in PNH patients harbouring *FLNA* mutations, but the epileptic foci could involve ectopic neurons, normotopic cortex or both (Pizzo et al., 2017). Further key evidence about FLNA involvement in epileptogenesis came from Zhang and colleagues, who showed that downregulation of FLNA prevents seizures in a mouse model of focal cortical dysplasia (FCD) (Zhang et al., 2020). Indeed, the expression of FLNA was found to be increased in cortical foci resected from patients with FCD type II as well in rodent FCD models, and downregulating FLNA with either RNA interference or the small molecule PTI-125 reduced seizure frequency (Zhang et al., 2020). However, the molecular mechanisms through which FLNA promotes neuronal hyperexcitability still remain unknown.

To conclude, our present data show the role of FLNA in the development of cortical networks and have identified some of the molecular partners with which it influences dendritic maturation and synaptogenesis. Our data indicate that FLNA loss of function, beyond PNH genesis, significantly disrupts the development of the normotopic cortex. These changes could provide a pathophysiological substrate for the neuropathological disorders associated with *FLNA* mutations.

CRediT authorship contribution statement

Antonio Falace: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Lea Corbieres:** Investigation, Formal analysis, Data curation. **Catia Palminha:** Investigation, Formal analysis, Data curation. **Fabrizia Claudia Guarnieri:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Fabienne Schaller:** Investigation. **Emmanuelle Buhler:** Investigation. **Clara Tuccari di San Carlo:** Data curation. **Aurelie Montheil:** Investigation. **Françoise Watrin:** Formal analysis. **Jean Bernard Manent:** Formal analysis. **Alfonso Represa:** Writing – original draft, Visualization. **Antoine de Chevigny:** Writing – original draft, Visualization. **Emilie Pallesi-Pocachard:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Carlos Cardoso:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Resources, Project administration, Funding acquisition, Data curation, Conceptualization.

Declaration of competing interest

None.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

We thank Claudio Rivera for providing anti-cofilin and anti-phosphorylated cofilin antibodies and the Molecular and Cellular Biology Facility (PBMC), the Animal Core Facility and the Imaging Facility (inMagic) INMED platforms, Lucas Silvagnoli and Tangra Draia-Nicolau for their technical support.

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, European Community 7th Framework programs (Development and Epilepsy—Strategies for Innovative Research to improve diagnosis, prevention and treatment in children with difficult to treat Epilepsy [DESIRE], Health-F2-602531-2013 (A. F., A. R., C.C.), Fritz Thyssen Stiftung - 10.15.2.022MN (C. C and A.F.), Fondation Jérôme Lejeune - 1159-CC2013A (C.C), the French National Center for Scientific Research (A.R.) and by Ian Excellence Initiative of Aix–Marseille University/A*MIDEX grant (CALIN -R24002AA) of the French 'Investissements d'Avenir' programme. F. C. G. was supported by a postdoctoral fellowship from Fondazione Umberto Veronesi.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.nbd.2024.106558.

References

Aghakhani, Y., Kinay, D., Gotman, J., Soualmi, L., Andermann, F., Olivier, A., Dubeau, F., 2005. The role of periventricular nodular heterotopia in epileptogenesis. Brain 128, 641–651. https://doi.org/10.1093/brain/awh388.

Aprea, J., Nonaka-Kinoshita, M., Calegari, F., 2014. Generation and characterization of Neurod1-CreER(T2) mouse lines for the study of embryonic and adult neurogenesis. Genesis 52, 870–878. https://doi.org/10.1002/dvg.22797.

Ayala, R., Shu, T., Tsai, L.H., 2007. Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. Cell 128, 29–43. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.021.

Bamburg, J.T., Minamide, L.S., Wiggan, O., Tahtamouni, L.H., Kuhn, T.B., 2021. Cofilin and actin dynamics: multiple modes of regulation and their impacts in neuronal development and degeneration. Cells 10, 2726. https://doi.org/10.3390/cells10102726.

Banka, S., Bennington, A., Baker, M.J., Rijckmans, E., Clemente, G.D., Ansor, N.M., Sito, H., Prasad, P., Anyane-Yeboa, K., Badalato, L., et al., 2022. Activating RAC1 variants in the switch II region cause a developmental syndrome and alter neuronal morphology. Brain 145, 4232–4245. https://doi.org/10.1093/brain/awac049.

Bär, J., Kobler, O., van Bommel, B., Mikhaylova, M., 2016. Periodic F-actin structures shape the neck of dendritic spines. Sci. Rep. 6, 37136. https://doi.org/10.1038/srep37136.

Bokoch, G.M., 2003. Biology of the p21-activated kinases. Annu. Rev. Biochem. 72, 743–781. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161742.

Bozzi, Y., Provenzano, G., Casarosa, S., 2018. Neurobiological bases of autism-epilepsy comorbidity: a focus on excitation/inhibition imbalance. Eur. J. Neurosci. 47, 534–548. https://doi.org/10.1111/ejn.13595.

Carabalona, A., Beguin, S., Pallesi-Pocachard, E., Buhler, E., Pellegrino, C., Arnaud, K., Hubert, P., Oualha, M., Siffroi, J.P., Khantane, S., et al., 2012. A glial origin for periventricular nodular heterotopia caused by impaired expression of Filamin-a. Hum. Mol. Genet. 21, 1004–1017. https://doi.org/10.1093/hmg/ddr531.

Chai, X., Zhao, S., Fan, L., Zhang, W., Lu, X., Shao, H., Wang, S., Song, L., Failla, A.V., Zobiak, B., Mannherz, H.G., Frotscher, M., 2016. Reelin and cofilin cooperate during the migration of cortical neurons: a quantitative morphological analysis. Development 143, 1029–1040. https://doi.org/10.1242/dev.134163.

Cingolani, L.A., Goda, Y., 2008. Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. Nat. Rev. Neurosci. 9, 344–356. https://doi.org/10.1038/nrn2373.

Costa, J.F., Dines, M., Lamprecht, R., 2020. The role of Rac GTPase in dendritic spine morphogenesis and memory. Front. Synaptic. Neurosci. 12, 12. https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00012.

de Curtis, I., 2008. Functions of Rac GTPases during neuronal development. Dev. Neurosci. 30, 47–58. https://doi.org/10.1159/000109851.

Dubeau, F., Tampieri, D., Lee, N., Andermann, E., Carpenter, S., Leblanc, R., Olivier, A., Radtke, R., Villemure, J.G., Andermann, F., 1995. Periventricular and subcortical nodular heterotopia. A study of 33 patients. Brain 118, 1273–1287. https://doi.org/10.1093/brain/118.5.1273.

Edwards, D.C., Sanders, L.C., Bokoch, G.M., Gill, G.N., 1999. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. Nat. Cell Biol. 11 (5), 253–259. https://doi.org/10.1038/12963.

Falace, A., Buhler, E., Fadda, M., Watrin, F., Lippiello, P., Pallesi-Pocachard, E., Baldelli, P., Benfenati, F., Zara, F., Represa, A., et al., 2014. TBC1D24 regulates neuronal migration and maturation through modulation of the ARF6-dependent pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111, 2337–2342. https://doi.org/10.1073/pnas.1316294111.

Feng, Y., Chen, M.H., Moskowitz, I.P., Mendonza, A.M., Vidali, L., Nakamura, F., Kwiatkowski, D.J., Walsh, C.A., 2006. Filamin a (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 19836–19841. https://doi.org/10.1073/pnas.0609628104.

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. https://doi.org/10.1093/hmg/ddn377.

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. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80651-0.

Fry, A.E., Kerr, M.P., Gibbon, F., Turnpenny, P.D., Hamandi, K., Stoodley, N., Robertson, S.P., Pilz, D.T., 2013. Neuropsychiatric disease in patients with periventricular heterotopia. J. Neuropsychiatr. Clin. Neurosci. 25, 26–31. https://doi.org/10.1176/appi.neuropsych.11110336.

Gardel, M.L., Nakamura, F., Hartwig, J.H., Crocker, J.C., Stossel, T.P., Weitz, D.A., 2006. Prestressed F-actin networks cross-linked by hinged filamins replicate mechanical properties of cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 1762–1767. https://doi.org/10.1073/pnas.0504777103.

Gilman, S.R., Iossifov, I., Levy, D., Ronemus, M., Wigler, M., Vitkup, D., 2011. Rare *de novo* variants associated with autism implicate a large functional network of genes involved in formation and function of synapses. Neuron 70, 898–907. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.021.

Golden, S.A., Christoffel, D.J., Heshmati, M., Hodes, G.E., Magida, J., Davis, K., Cahill, M. E., Dias, C., Ribeiro, E., Ables, J.L., et al., 2013. Epigenetic regulation of RAC1 induces synaptic remodeling in stress disorders and depression. Nat. Med. 19, 337–344. https://doi.org/10.1038/nm.3090.

Gross, G.G., Junge, J.A., Mora, R.J., Kwon, H.B., Olson, C.A., Takahashi, T.T., Liman, E. R., Ellis-Davies, G.C., McGee, A.W., Sabatini, B.L., et al., 2013. Recombinant probes for visualizing endogenous synaptic proteins in living neurons. Neuron 78, 971–985. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.04.017.

Guarnieri, F., Falace, A., de Chevigny, A., Cardoso, C., 2018. Disorders of neurogenesis and cortical development. Dialogues Clin. Neurosci. 20, 255–266. https://doi.org/10.31887/DCNS.2018.20.4/ccardoso.

Guerrini, R., Dobyns, W.B., 2014. Malformations of cortical development: clinical features and genetic causes. Lancet Neurol. 13, 710–726. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70040-7.

Hart, A.W., Morgan, J.E., Schneider, J., West, K., McKie, L., Bhattacharya, S., Jackson, I. J., Cross, S.H., 2006. Cardiac malformations and midline skeletal defects in mice lacking filamin a. Hum. Mol. Genet. 15, 2457–2467. https://doi.org/10.1093/hmg/ddl168.

Hiromoto, Y., Azuma, Y., Suzuki, Y., Hoshina, M., Uchiyama, Y., Mitsuhashi, S., Miyatake, S., Mizuguchi, T., Takata, A., Miyake, N., et al., 2020. Hemizygous FLNA variant in West syndrome without periventricular nodular heterotopia. Hum. Genome. Var. 7, 43. https://doi.org/10.1038/s41439-020-00131-9.

Hotulainen, P., Hoogenraad, C.C., 2010. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. J. Cell Biol. 189, 619–629. https://doi.org/10.1083/jcb.201003008.

Jan, Y.N., Jan, L.Y., 2010. Branching out: mechanisms of dendritic arborization. Nat. Rev. Neurosci. 11, 316–328. https://doi.org/10.1038/nrn2836.

Jobin, M.L., Siddig, S., Koszegi, Z., Lanoiselée, Y., Khayenko, V., Sungkaworn, T., Werner, C., Seier, K., Misigaiski, C., Mantovani, G., et al., 2023. Filamin a organizes γ-aminobutyric acid type B receptors at the plasma membrane. Nat. Commun. 14, 34. https://doi.org/10.1038/s41467-022-35708-1.

Kaas, J.H., 2013. The evolution of brains from early mammals to humans. Wiley Interdiscip. Rev. Cogn. Sci. 4, 33–45. https://doi.org/10.1002/wcs.1206.

Kandel, E.R., Squire, L.R., 2000. Neuroscience: breaking down scientific barriers to the study of brain and mind. Science 290, 1113–1120. https://doi.org/10.1126/science.290.5494.1113.

Korobova, F., Svitkina, T., 2010. Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. Mol. Biol. Cell 21, 165–176. https://doi.org/10.1091/mbc.e09-07-0596.

Lee, J.H., Kreitzer, A.C., Singer, A.C., Schiff, N.D., 2017. Illuminating neural circuits: from molecules to MRI. J. Neurosci. 37, 10817–10825. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2569-17.2017.

Lian, G., Lu, J., Hu, J., Zhang, J., Cross, S.H., Ferland, R.J., Sheen, V.L., et al., 2012. Filamin a regulates neural progenitor proliferation and cortical size through Wee1-dependent Cdk1 phosphorylation. J. Neurosci. 32, 7672–7684. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0894-12.2012.

Lian, G., Wong, T., Lu, J., Hu, J., Zhang, J., Sheen, V., 2019. Cytoskeletal associated Filamin A and RhoA affect neural progenitor specification during mitosis. Cereb. Cortex 29, 1280–1290. https://doi.org/10.1093/cercor/bhy033.

Llano, O., Smirnov, S., Soni, S., Golubtsov, A., Guillemin, I., Hotulainen, P., Medina, I., Nothwang, H.G., Rivera, C., Ludwig, A., 2015. KCC2 regulates actin dynamics in dendritic spines via interaction with β-PIX. J. Cell Biol. 209, 671–686. https://doi.org/10.1083/jcb.201411008.

Lodato, S., Arlotta, P., 2015. Generating neuronal diversity in the mammalian cerebral cortex. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 31, 699–720. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125353.

Ma, B., Shan, X., Yu, J., Zhu, T., Li, R., Lv, H., Cheng, H., Zhang, T., Wang, L., Wei, F., et al., 2022. Social deficits via dysregulated Rac1-dependent excitability control of prefrontal cortical neurons and increased GABA/glutamate ratios. Cell Rep. 41, 111722 https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111722.

Minegishi, T., Kastian, R.F., Inagaki, N., 2023. Mechanical regulation of synapse formation and plasticity. Semin. Cell Dev. Biol. 140, 82–89. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.05.017.

Nakamura, F., 2013. FilGAP and its close relatives: a mediator of rho-Rac antagonism that regulates cell morphology and migration. Biochem. J. 453, 17–25. https://doi.org/10.1042/BJ20130290.

Nakamura, F., Heikkinen, O., Pentikäinen, O.T., Osborn, T.M., Kasza, K.E., Weitz, D.A., Kupiainen, O., Permi, P., Kilpeläinen, I., Ylänne, J., et al., 2009. Molecular basis of filamin A-FilGAP interaction and its impairment in congenital disorders associated with filamin a mutations. PLoS One 4, e4928. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004928.

Nelson, A.D., Bender, K.J., 2021. Dendritic integration dysfunction in neurodevelopmental disorders. Dev. Neurosci. 43, 201–221. https://doi.org/10.1159/000516657.

Nestor, M.W., Hoffman, D.A., 2012. Aberrant dendritic excitability: a common pathophysiology in CNS disorders affecting memory? Mol. Neurobiol. 45, 478–487. https://doi.org/10.1007/s12035-012-8265-x.

Nguyen, L.S., Jolly, L., Shoubridge, C., Chan, W.K., Huang, L., Laumonnier, F., Raynaud, M., Hackett, A., Field, M., Rodriguez, J., et al., 2012. Transcriptome profiling of UPF3B/NMD-deficient lymphoblastoid cells from patients with various forms of intellectual disability. Mol. Psychiatry 17, 1103–1115. https://doi.org/10.1038/mp.2011.163.

Noam, Y., Phan, L., McClelland, S., Manders, E.M., Ehrengruber, M.U., Wadman, W.J., Baram, T.Z., Chen, Y., 2012. Distinct regional and subcellular localization of the actin-binding protein filamin a in the mature rat brain. J. Comp. Neurol. 520, 3013–3034. https://doi.org/10.1002/cne.23106.

Ohta, Y., Hartwig, J.H., Stossel, T.P., 2006. FilGAP, a rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin a to control actin remodelling. Nat. Cell Biol. 8, 803–814. https://doi.org/10.1038/ncb1437.

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. https://doi.org/10.1093/brain/awl125.

Penzes, P., Cahill, M.E., Jones, K.A., Srivastava, D.P., 2008. Convergent CaMK and RacGEF signals control dendritic structure and function. Trends Cell Biol. 18, 405–413. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.07.002.

Pizzo, F., Roehri, N., Catenoix, H., Medina, S., McGonigal, A., Giusiano, B., Carron, R., Scavarda, D., Ostrowsky, K., Lepine, A., et al., 2017. Epileptogenic networks in nodular heterotopia: a stereoelectroencephalography study. Epilepsia 58, 2112–2123. https://doi.org/10.1111/epi.13919.

Pyronneau, A., He, Q., Hwang, J.Y., Porch, M., Contractor, A., Zukin, R.S., 2017. Aberrant Rac1-cofilin signaling mediates defects in dendritic spines, synaptic function, and sensory perception in fragile X syndrome. Sci. Signal. 10, eaan0852 https://doi.org/10.1126/scisignal.aan0852.

Rakic, P., 2009. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. Nat. Rev. Neurosci. 10, 724–735. https://doi.org/10.1038/nrn2719.

Reijnders, M.R.F., Ansor, N.M., Kousi, M., Yue, W.W., Tan, P.L., Clarkson, K., Clayton-Smith, J., Corning, K., Jones, J.R., Lam, W.W.K., et al., 2017. RAC1 missense mutations in developmental disorders with diverse phenotypes. Am. J. Hum. Genet. 10, 466–477. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.08.007.

Rodriguez, A., Ehlenberger, D.B., Dickstein, D.L., Hof, P.R., Wearne, S.L., 2008. Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. PLoS One 3, e1997. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001997.

Rust, M.B., 2015. ADF/cofilin: a crucial regulator of synapse physiology and behavior. Cell. Mol. Life Sci. 72, 3521–3529. https://doi.org/10.1007/s00018-015-1941-z.

Segura, I., Lange, C., Knevels, E., Moskalyuk, A., Pulizzi, R., Eelen, G., Chaze, T., Tudor, C., Boulegue, C., Holt, M., et al., 2016. The oxygen sensor PHD2 controls dendritic spines and synapses via modification of Filamin a. Cell Rep. 14, 2653–2667. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.047.

Sheen, V.L., 2014. Filamin a mediated Big2 dependent endocytosis: from apical abscission to periventricular heterotopia. Tissue Barr. 2, e29431 https://doi.org/10.4161/tisb.29431.

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. https://doi.org/10.1093/hmg/11.23.2845.

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. https://doi.org/10.1136/jnnp.2008.162263.

Staley, K., 2015. Molecular mechanisms of epilepsy. Nat. Neurosci. 18, 367–372. https://doi.org/10.1038/nn.3947.

Sutherland-Smith, A.J., 2011. Filamin structure, function and mechanics: are altered filamin-mediated force responses associated with human disease? Biophys. Rev. 3, 15–23. https://doi.org/10.1007/s12551-011-0042-y.

Tahirovic, S., Hellal, F., Neukirchen, D., Hindges, R., Garvalov, B.K., Flynn, K.C., Stradal, T.E., Chrostek-Grashoff, A., Brakebusch, C., Bradke, F., 2010. Rac1 regulates neuronal polarization through the WAVE complex. J. Neurosci. 30, 6930–6943. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5395-09.2010.

Threadgill, R., Bobb, K., Ghosh, A., 1997. Regulation of dendritic growth and remodeling by rho, Rac, and Cdc42. Neuron 19, 625–634. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80376-1.

Wegiel, J., Kuchna, I., Nowicki, K., Imaki, H., Wegiel, J., Marchi, E., Ma, S.Y., Chauhan, A., Chauhan, V., Bobrowicz, T.W., et al., 2010. The neuropathology of autism: defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. Acta Neuropathol. 119, 755–770. https://doi.org/10.1007/s00401-010-0655-4.

Wei, C.M., Xia, G.Z., Ren, R.N., 2018. Gene mutations in unexplained infantile epileptic encephalopathy: an analysis of 47 cases. Zhongguo Dang. Dai. Er. Ke. Za. Zhi. Chin. 20, 125–129. https://doi.org/10.7499/j.issn.1008-8830.2018.02.009.

Xiang, X., Li, S., Zhuang, X., Shi, L., 2016. Arhgef1 negatively regulates neurite outgrowth through activation of RhoA signaling pathways. FEBS Lett. 590, 2940–2955. https://doi.org/10.1002/1873-3468.12339.

Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E., Mizuno, K., 1998. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. Nature 25 (393), 809–812. https://doi.org/10.1038/31735.

Zamboni, V., Armentano, M., Berto, G., Ciraolo, E., Ghigo, A., Garzotto, D., Umbach, A., Di Cunto, F., Parmigiani, E., Boido, M., et al., 2018. Hyperactivity of Rac1-GTPase pathway impairs neuritogenesis of cortical neurons by altering actin dynamics. Sci. Rep. 8, 7254. https://doi.org/10.1038/s41598-018-25354-3.

Zhang, L., Bartley, C.M., Gong, X., Hsieh, L.S., Lin, T.V., Feliciano, D.M., Bordey, A., 2014. MEK-ERK1/2-dependent FLNA overexpression promotes abnormal dendritic patterning in tuberous sclerosis independent of mTOR. Neuron 84, 78–91. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.09.009.

Zhang, L., Huang, T., Teaw, S., Nguyen, L.H., Hsieh, L.S., Gong, X., Burns, L.H., Bordey, A., 2020. FilaminA inhibition reduces seizure activity in a mouse model of focal cortical malformations. Sci. Transl. Med. 12, eaay0289 https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay0289.

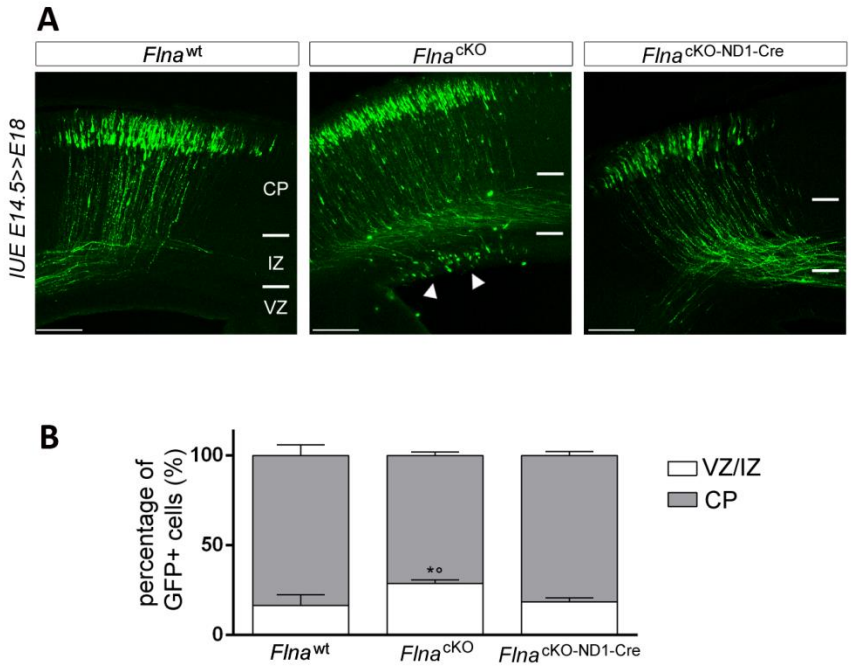


Fig. S1. A) Representative images of E18 coronal sections of *Flna*^{cKO} electroporated at E14.5 with the GFP plasmid (*Flna*^{wt}) or CAGGS-CRE and pCALNL-GFP (*Flna*^{cKO}) or NeuroD1-CRE and pCALNL-GFP (*Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}CRE}$). In *Flna*^{cKO} electroporated cortices some cells failed to migrate and persisted in the Ventricular Zone (arrowheads). (scale bar, 200μm). **B**) Quantification of GFP-positive cell distribution expressed as a percentage of total transfected cells. Data, expressed as means ±SEM, were compared via one-way ANOVA for repeated measures. *P<0.05 vs *Flna*^{wt} ,° P<0.05 vs *Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}CRE}$. CP: cortical plate; IZ: intermediate zone; VZ: ventricular zone.

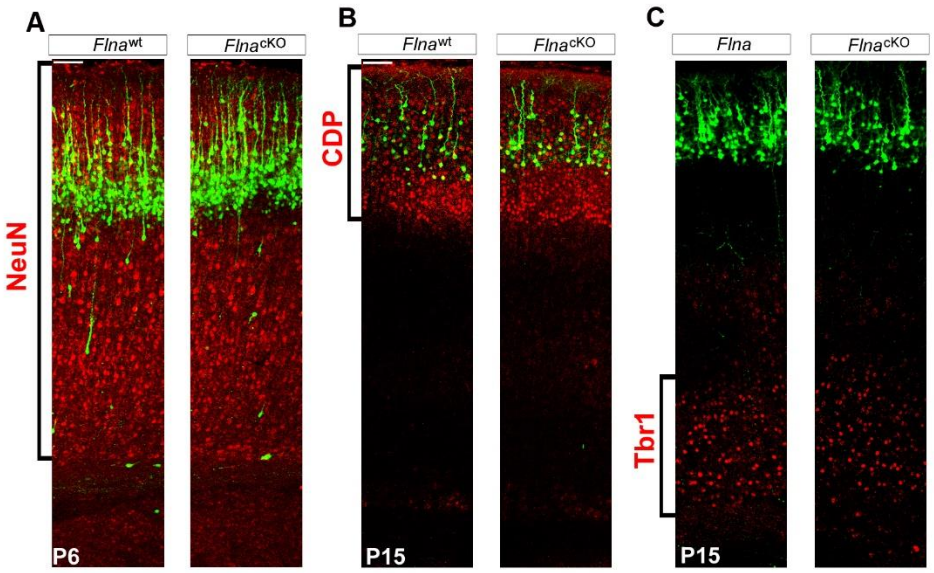


Fig. S2. A) Representative coronal sections of *Flna*$^{floxl/flox}$ P6 mouse brains electroporated at E14.5 with GFP (*Flna*^{wt}) or pCALNL-GFP and pCAG-Cre (*Flna*^{cKO}) immunostained with the neuronal marker NeuN. (Scale bar: 200 μm.) **B-C**) Representative coronal sections of *Flna*$^{floxl/flox}$ P15 mouse brains electroporated as in A and immunostained with cortical II–IV layers marker CDP and the V–VI layers marker FoxP2. (Scale bar: 500 μm.)

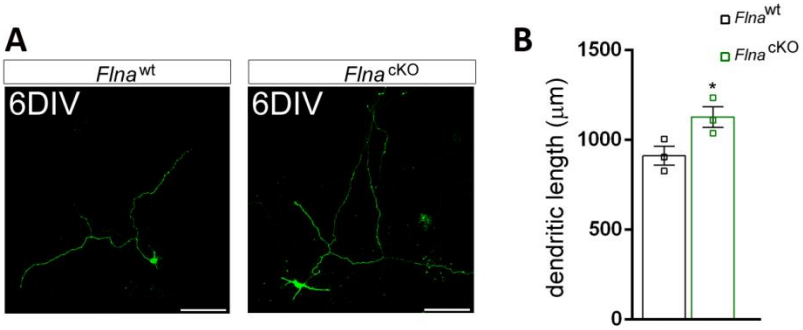


Fig. S3. A) Representative images of 6 days *in vitro* (DIV) cultured *FlnA*^{cKO} cortical neurons transfected at 3DIV with the indicated plasmids (scale bar, 50µm). **B**) Histogram showing quantitative analysis of total neurite length (three independent preparations; 30-40 cells for each group). Data are means ± SEM were analyzed by paired two-tailed t test. *P < 0.01.

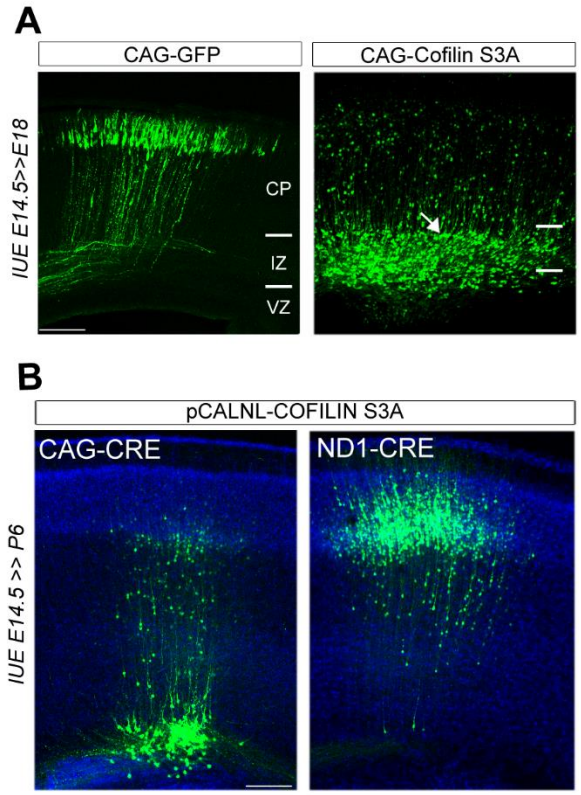


Fig. S4. A) Representative images of E18 coronal sections of mice brains electroporated at E14.5 with the pCAGIG-GFP plasmid (CAG-GFP) or pEGFP-N1 human cofilin S3A (CAG-Cofilin S3A). Constitutive expression under the CAG promoter of Cofilin S3A induced a strong migration defect, with most of the cells persisting in the IZ four days after electroporation (arrow) (scale bar, 200 μm). **B**) Representative images of coronal sections of *Flna*$^{floxl/flox}$ P6 mouse brains electroporated at E14.5 + pCALNL-GFP +pCALNL-Cofilin S3A and CAG-CRE (left panel) or with NeuroD1-CRE (ND1-CRE, right panel). Images were counterstained with DAPI (Scale bar: 500 μm). Selective expression of Cofilin S3A in postmitotic neurons did not affect migration toward the cortical plate in *Flna* depleted cells.

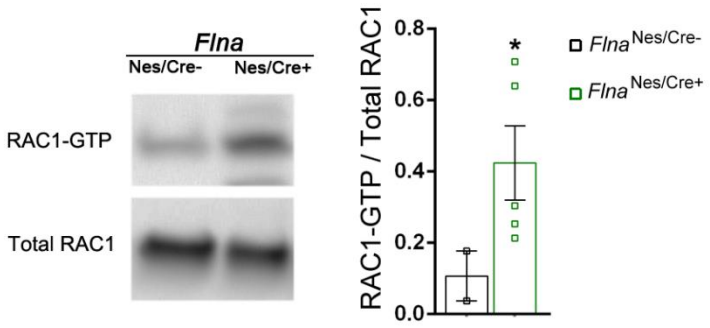


Fig. S5. Representative western blot (left) and summary data (right) assessing the ratio between RAC1-GTP and total RAC1 levels in brain lysates of P15 cortex of *Flna*$^{\text{Nestin-Cre+/y}}$ hemizygote males (Nes/Cre+) and *Flna*$^{\text{Nestin-Cre-/y}}$ (Nes/Cre-) control males. Active GTP-bound RAC1 was precipitated with GST-PKD from brain lysates. Data are means ±SEM and were analysed by Mann-Whitney test. * P<0.05. Flna$^{\text{Nestin-Cre-/y}}$ n= 3; Flna$^{\text{Nestin-Cre+/y}}$ n =5.

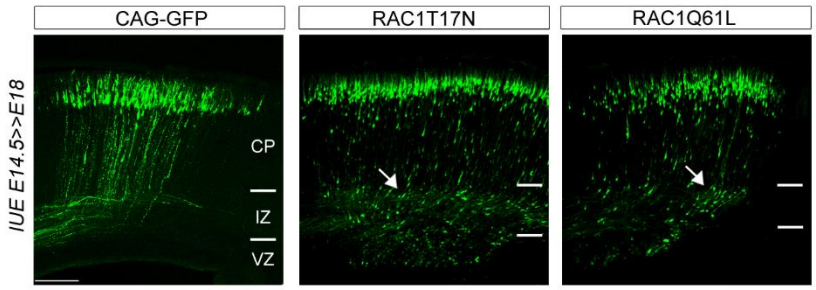


Fig. S6. Representative images of E18 coronal sections of brains electroporated at E14.5 brains with the pCAGIG-GFP plasmid (GFP) or pCAGIG-RAC1T17N (RAC1T17N) or pCAGIG-RAC1Q61L (RAC1Q61L). In RAC1T17N and RAC1Q61L electroporated cortices a subset of developing neurons (arrows) persisted in the IZ four days after electroporation (scale bar, 200 μm).

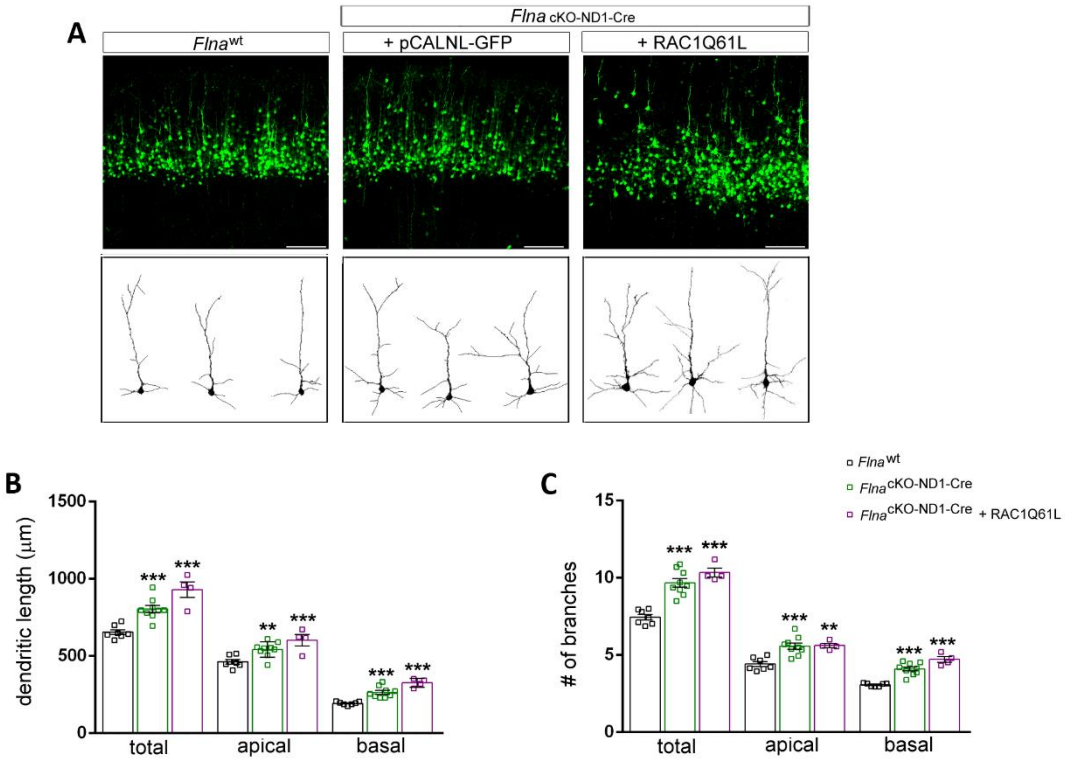


Fig. S7. **A**) *Higher panels***,** representative coronal sections of P6 *Flna*$^{flox/flox}$ mouse brains electoporated at E14.5 with GFP (*Flna*^{wt}) or pCALNL-GFP + NeuroD1-CRE (*Flna*^{cKO}) alone or in combination with pCALNL-RAC1Q61L (*Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$ + RAC1Q61L) (scale bar, 100µm). *Lower panels*, representative reconstructed layers II/III pyramidal neurons showing dendritic arborization patterns from the same experimental conditions shown above. **B-C**) Quantification of total dendritic outgrowth (**B**) and number of processes (**C**) separated into apical and basal dendrites (n=7 for *Flna*^{wt}; 11-32 neurons were reconstructed for each animal ;n=9 for *Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$, 12-30 reconstructed neurons for each animal; n=4 for *Flna*$^{cKO\text{-}ND1\text{-}Cre}$ + RAC1Q61L, 9-15 reconstructed neurons for each animal). Data are means ±SEM were compared via one-way ANOVA for repeated measures (***P < 0.001, **P < 0.01, *P<0.05 vs *Flna*^{wt}).

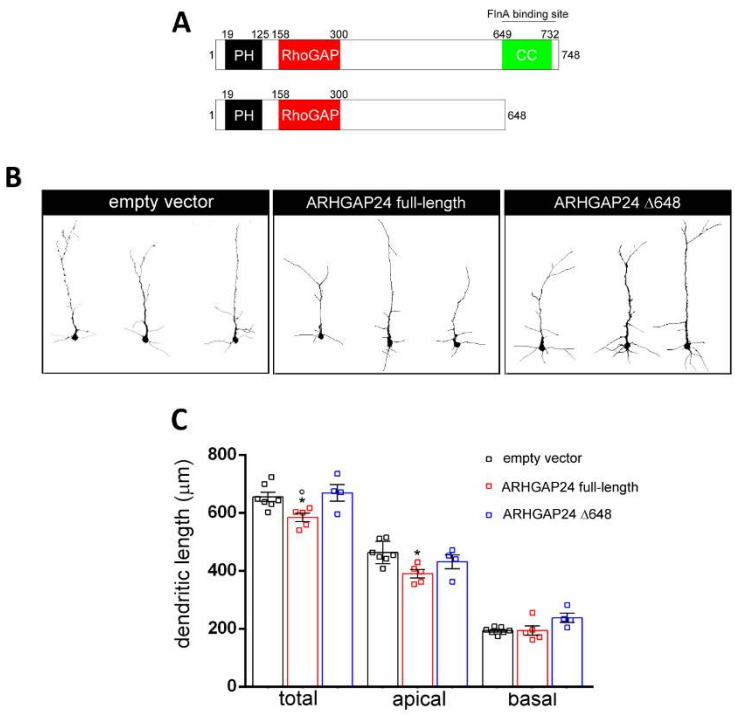


Fig. S8. A) Schematic representation of human ARHGAP24 protein. The pleckstrin-homology (PH), GTPase-activating protein (GAP), and coiled-coil (CC) domains predicted by EMBnet COILS are shown. The ARHGAP24Δ648 truncated form lacking the FLNA binding site is also shown. **B**) Representative reconstructed layers II/III P6 pyramidal neurons showing dendritic arborization patterns of *Flna*$^{flox/flox}$ mice electroporated at E14.5 with GFP only (empty vector) or pCAGIG-ARHGAP24 full-length or pCAGIG-ARHGAP24Δ648. **C**) Quantification of total dendrite outgrowth separated into apical and basal dendrites (n=7 for empty vector, 11-32 neurons were reconstructed for each animal; n=5 for pCAGIG-ARHGAP24 full-length, 9-19 neurons were reconstructed for each animal; n=4 for or pCAGIG-ARHGAP24Δ648, 10-22 neurons were reconstructed for each animal). Data are means ±SEM and were analysed by paired two-tailed t test. *P < 0.05 vs empty vector, °P < 0.05 vs pCAGIG-ARHGAP24Δ648.

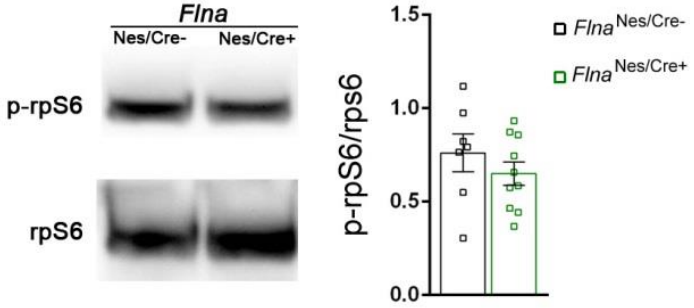


Fig. S9. Representative western blot (left) and summary data (right) assessing the abundance of phosphorylated (p-) rpS6 in brain lysates of P15 cortex of *Flna*$^{\text{Nestin-Cre+/y}}$ hemizygote males (Nes/Cre+) and *Flna*$^{\text{Nestin-Cre-/y}}$ (Nes/Cre-) control males. Data are means ±SEM and were analysed by paired two-tailed t test. Flna$^{\text{Nestin-Cre-/y}}$ n ≥ 7; Flna$^{\text{Nestin-Cre+/y}}$ n =10.

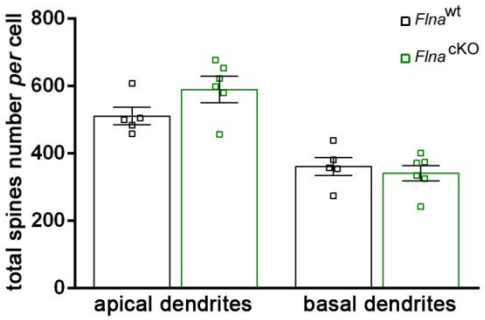


Fig. S10. Graph showing total number of putative spines *per* cell calculated by multiplying total dendritic length for spines density (separated in apical and basal) for each P15 animal.

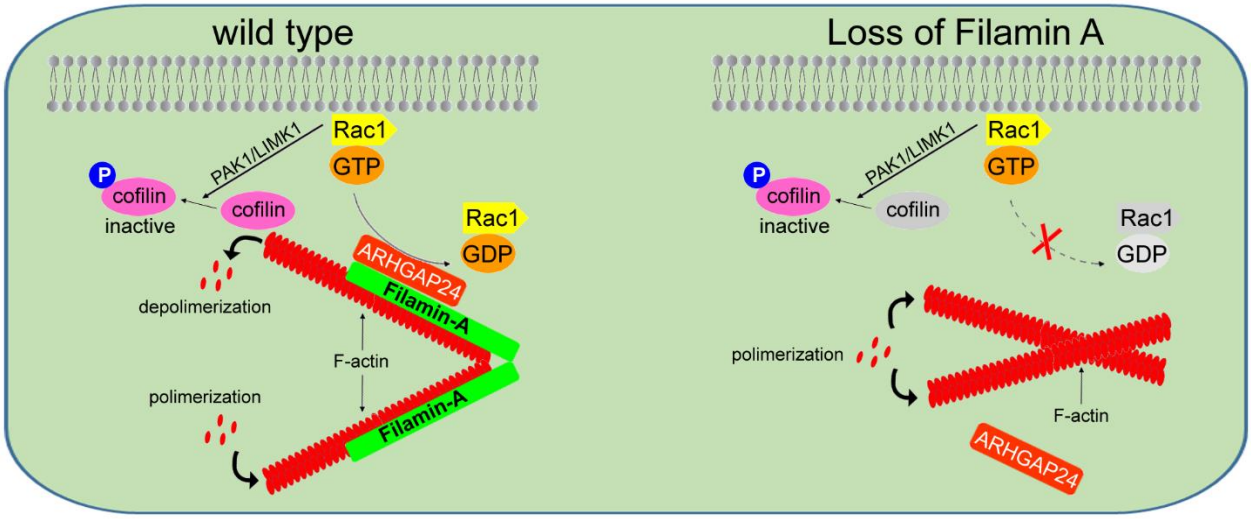


Fig. S11. Proposed model for the function of Filamin A protein in developing neurons. A tight ARHGAP24-dependent control of RAC1 pathway is physiologically required during morphological changes underlying functional maturation of cortical neurons. Active RAC1-GTP leads to the phosphorylation and consequent inactivation of Cofilin. Loss of Filamin A could result in the decoupling of ARHGAP24/RAC1 followed by increased RAC1-GTP and consequent inactivation of Cofilin.

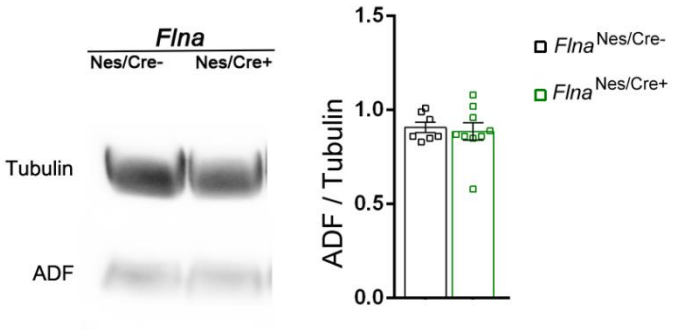


Fig. S12. Representative western blot (left) and summary data (right) assessing the abundance of ADFin brain lysates of P15 cortex of Flna$^{Nestin\text{-}Cre+/y}$ hemizygote males (Nes/Cre+) and Flna$^{Nestin\text{-}Cre-/y}$ (Nes/Cre-) control males. Data are means ±SEM and were analysed by paired two-tailed t test. Flna$^{Nestin\text{-}Cre-/y}$ n ≥ 7; Flna$^{Nestin\text{-}Cre+/y}$ n =10.

Figure 5 and Figure S9

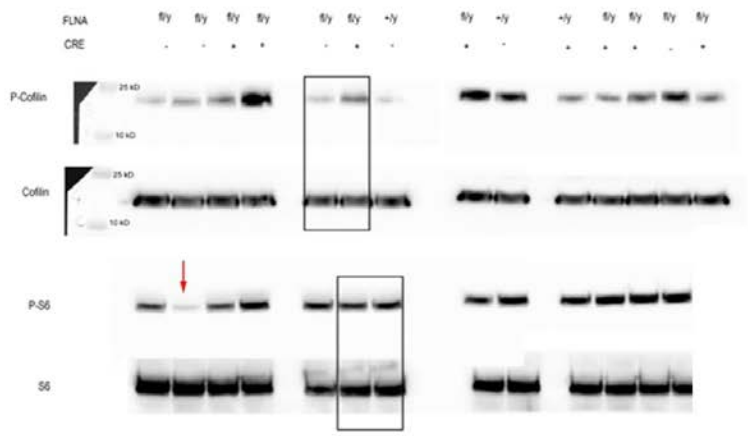


Figure S5

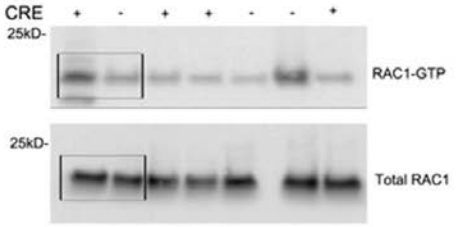


Figure S12

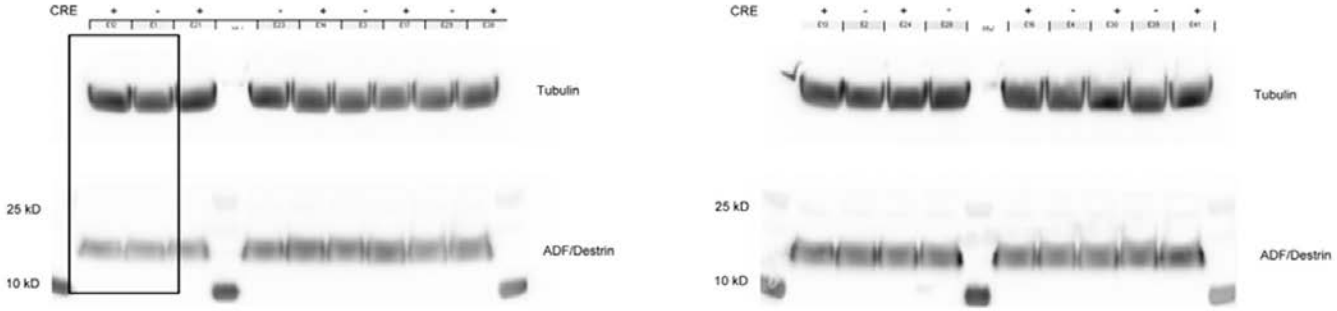


Fig. S13. Full blots

PARTIE II

Partie II. 1 : Identification de variants faux sens dans le gène *FAT1* associée à une PVNH

Grâce à notre réseau de cliniciens nous avons eu accès à de l'ADN un fœtus de 24 semaines présentant une PVNH bilatérale sévère associée à une ventriculomégalie (Introduction chapitre 2, partie 2.4, **Figure 33**). Il n'y avait aucun antécédent familial ni de consanguinité chez les parents. Les exomes du fœtus et des parents ont été séquencés par la technique de séquençage à haut débit (*Next-Generation Sequencing* ; NGS). Ce séquençage a été réalisé par la plateforme TAGC (*Theory and Approaches of Genomic Complexity*) à Marseille, à l'aide du séquenceur *NextSeq-500 Sequencer Illumina* et du système d'exploitation *Chromium*. Les données brutes générées sont alignées et annotées sur GRCh37/hg19 à l'aide des logiciels d'alignement intégrés à la plateforme *Chromium,* produisant un fichier au format. *bam*. Les variants nucléotidiques sont ensuite identifiés et annotés pour générer un fichier *.vcf*. A partir de ces fichiers *.bam* et *.vcf*, nous avons utilisé le logiciel VarAFT® (*Variant Annotation and Filtering Too*l ; https://www.marseille-medical-genetics.org/fr/actualite/varaft-un-outil-de-filtration-et-dannotations-des-donnees-de-sequencage/), un outil développé pour annoter et filtrer les variants en vue de leur priorisation. Ce logiciel permet non seulement de visualiser et de filtrer les variants à partir des formats *.vcf*, mais aussi de générer et de visualiser les données de couverture à partir des formats *.bam*. Il interroge automatiquement les bases de données disponibles et les sites de prédiction de pathogénicité (Desvignes et al., 2018), offrant ainsi un classement en fonction des modes de transmission et des critères de filtrage (ex. non-exoniques, fréquence dans la population). De plus, VarAFT® intègre des informations provenant des bases de données ExAC (*Exome Aggregation Consortium*) et 1000Genomes, facilitant ainsi l'évaluation de la fréquence des variants.

A la suite de cette première analyse, un protocole complet de sélection des variants a été élaboré à l'aide de bases de données accessibles en ligne. Tout d'abord, la base de données GnomAD (https://gnomad.broadinstitute.org/) nous a permis d'isoler les variants rares ou non répertoriés, en fixant un seuil et éliminant les variants présents à une fréquence supérieure à 10^{-3}. Ensuite, la base de données CADD (*Combined annotation-Dependant Depletion* ; https://cadd.gs.washington.edu/snv ; Kircher et al., 2014 ; Rentzsch et al., 2019) a été utilisée pour évaluer le score de pathogénicité des variants. Enfin, Genome Browser GRCh37/hg19 (http://www.genome.ucsc.edu/) a permis de

classer les variants en fonction de leurs types de mutations à savoir faux sens, synonyme et perte de fonction. Cette première analyse nous as permis de mettre en avant 16 gènes dont des mutations faux sens d'origine hétérozygote *compound* sur le gène *FAT1*.

Gène	Mutation	Héritage	Position chromosome ; SNV	Séquence variation
FAT1	Faux-sens	Paternel	chr4: 187540040 C > T	p.R2567H
		Maternel	chr4: 187630099 C > T	p.V295M

Figure 46. Les mutations sur le gène *FAT1*.

Les variants identifiés à partir des données de séquençage NGS sont validés par la technique de séquençage en Sanger. En effet une approche à haut débit peut générer des faux positifs. Afin de validée la présence de ces variants nous avons dessinée des amorces de PCR afin d'amplifier les amplicons contenant les différents variant sélectionnés. Seules les mutations du gènes FAT1 ont été validée. Afin de rechercher d'éventuelles mutations additionnelles, nous avons séquencé l'intégralité des 27 exons codants de *FAT1*. Les séquences codantes correspondantes ont été extraites de la base de données du NIH (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_005245.4), et les *primers* pour la PCR ont été conçues avec l'outil Primer3. Après analyse, la présence des deux mutations faux sens ont été confirmée dans le génome du fœtus (Figure 47). Elles sont également présentes pour l'une dans le génome du père et pour l'autre dans celui de la mère (Figure 47). Aucune autre mutation n'a été détectée.

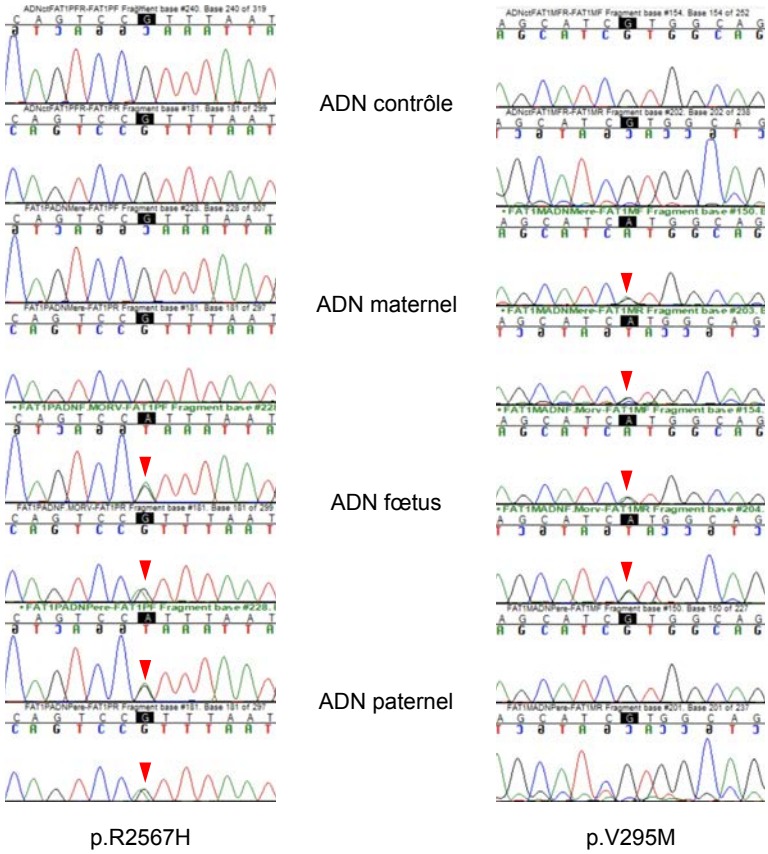


Figure 47. Validation des mutations *FAT1* par la méthode de SANGER.

Partie II. 2. Étude du profil d'expression de *Fat1*

En parallèle, nous avons cherché à savoir si Fat1 était exprimée dans le cortex cérébral durant le développement. Le profil d'expression de *FAT1* a été analysé à partir de différentes bases de données de *RNA-seq* issues de tissus cérébraux de fœtus humain entre 17 et 21 semaines de gestation (http://solo.bmap.ucla.edu/shiny/webapp/ ; Klingler et al., 2021 ; Nowakowski et al., 2017 ; Polioudakis et al., 2019 ; Figure 48), d'organoïdes cérébraux dérivés de cellules humaines (https://www.humous.org ; Klingler et al., 2021 ; Pollen et al., 2019 ; Figure 48) et de cerveaux d'embryons de souris (https://www.humous.org ; Klingler et al., 2021 ; Telley et al., 2019 ; Figure 48). Ces données d'expressions indique que *FAT1* est exprimé dans le cerveau, en particulier dans les RGa au cours du développement embryonnaire.

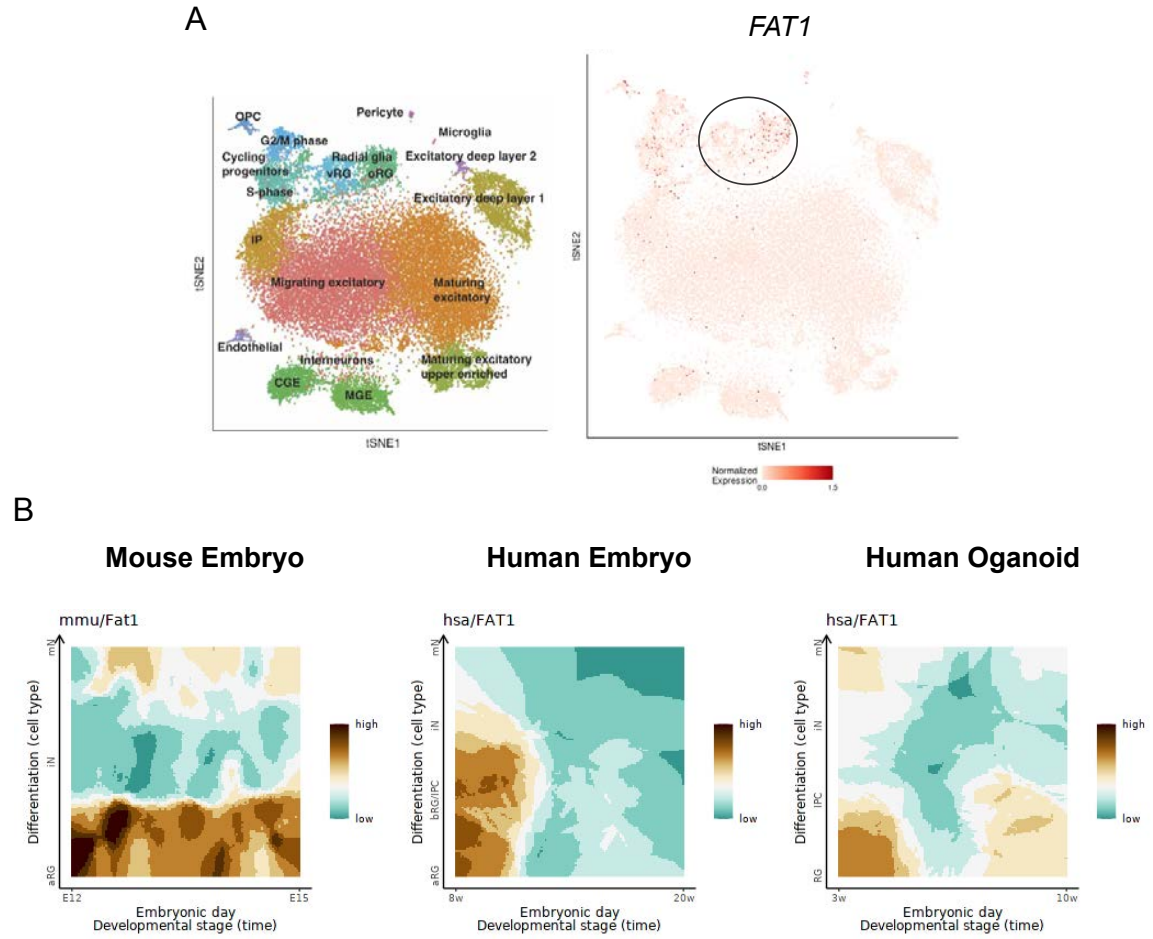


Figure 48. Profil d'expression de *FAT1*. (A) Graphique *tSNE* montrant l'expression de *FAT1* dans différents types cellulaires issus de tissus cérébraux humains. (B) Graphique illustrant la dynamique d'expression du gène *FAT1* en fonction de l'âge embryonnaire et du type cellulaire chez des embryons de souris, du tissu fœtal humain et des organoïdes de cellules humaines. Adapté des bases de données de *Pouloudiakis et al., 2019 ; Klingler et al., 2021.*

Nous avons voulu nous caractériser *in vivo* dans quelles population cellulaire *Fat1* pouvais être exprimée durant les stades embryonnaire précoce. Pour cela, nous avons utilisé la souris $Fat1^{LacZ/-}$, issue d'une collaboration avec le Dr Françoise Helmbacher nous permettant d'investiguer l'expression de *Fat1* au sein des tissus (Caruso et al., 2013). Nos résultats montrent qu'à E14.5, *Fat1* est exprimée dans les cellules localisées dans VZ/SVZ qui correspondent aux zones de genèse et qui contiennent les progéniteurs apicaux (Figure 49. A). De plus, Fat1 est exprimé dans certaines cellules qui correspondent à la localisation de la SP (Figure 49. A),

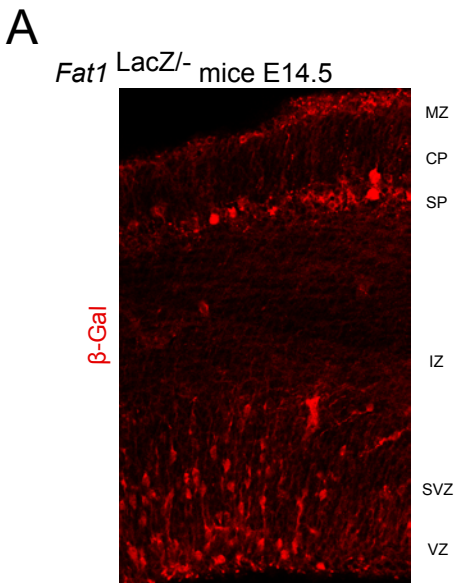


Figure 49. *Fat1* est exprimée dans la VZ/SVZ et la SP en embryonnaire. (A) Acquisition au microscope confocal d'une colonne corticale d'un cerveau embryonnaire E14.5 d'une souris *Fat1*$^{LacZ/+}$ marqué avec un anticorps anti-βGal révélant la présence de *Fat1*.

FAT1 apparaît ainsi comme un gène candidat prometteur dans l'étiologie des PVNH, mais son rôle précis dans le développement cortical reste encore peu exploré. En effet, il a déjà été démontré qu'il jouait un rôle dans la régulation de la prolifération neuronale (Badouel et al., 2015). Cependant, son rôle dans les différentes étapes clés de la corticogénèse, telles que la migration neuronale, la lamination corticale et la maturation des neurones n'a jamais été étudié.

Partie II.3 – Article 2

Atypical cadherin Fat1 regulates radial migration and morphology of newborn neurons in the developing cortex

Léa Corbières[a], Lucas Silvagnoli[a], Victoria Ginaux[a], Emmanuelle Buhler[a], Emilie Pallesi-Pocachard[a], Françoise Helmbacher[b], Carlos Cardoso[a]

[a] INMED, INSERM UMR1249, Aix Marseille University, Parc Scientifique de Luminy, Marseille, France

[b] Aix Marseille Univ, CNRS, IBDM UMR 7288, Parc Scientifique de Luminy, Case 907, 13288 Marseille, France

In prep.

Problématique : La formation du cortex cérébral repose sur la génération d'un nombre approprié de neurones, leur positionnement précis au sein des différentes couches corticales, ainsi que de leur maturation adéquate afin d'établir un réseau cortical fonctionnel. La superfamille des cadhérines joue un rôle crucial en médiant de nombreux processus au cours du développement cérébral, notamment l'adhérence cellulaire et la perception des informations environnante. Cependant, le rôle spécifique de la sous-famille des cadhérines atypiques dans la corticogenèse reste encore peu étudié. Dans cette étude, nous visons à mieux caractériser le rôle de la cadhérine atypique Fat1 dans la migration neuronale, l'établissement de la lamination corticale, ainsi que dans la formation de l'arbre dendritique.

Méthodes : Pour aborder cette problématique, nous avons généré un modèle *Fat1 knockdown* par injection intracérébroventriculaire et électroporation *in utero* (IUE) d'un ARN interférent dirigé contre *Fat1* afin d'étudier la migration et la maturation neuronales. Nous avons également généré un second modèle *Fat1 knockout* conditionnel ($FAT1^{flx/flx}EMX1^{CRE}$) permettant une invalidation de *Fat1* spécifiquement dans les neurones pyramidaux excitateurs afin d'étudier la lamination corticale.

Résultats principaux : Nos résultats montrent que *Fat1* joue un rôle dans la migration radiale des neurones et régule la polarité et la morphologie des neurones post-mitotique. De plus, *Fat1* régule la formation de l'arbre dendritique apical. *Fat1* participe également à l'établissement de lamination du cortex somatosensoriel. Dans l'ensemble, notre étude permet d'établir un nouveau rôle de la cadhérine atypique Fat1 dans le développement cortical.

Dans cette étude, j'ai réalisé les IUE, les marquage et acquisition aux microscopes, quantifications et analyses statistiques. Les expériences de RT-PCR et de Western Blot ont été réalisés par la plateforme PBMC de l'INMED. Les analyses de morphologie (circularité et reconstructions) ont été réalisé par Lucas Silvagnoli. Les coupes et les marquages pour la lamination corticale ont été réalisée avec l'aide de Victoria Ginaux.

Atypical cadherin Fat1 regulates radial migration and morphology of newborn neurons in the developing cortex

Léa Corbières[a], Lucas Silvagnoli[a], Victoria Ginaux[a], Emmanuelle Buhler[a], Emilie Pallesi-Pocachard[a], Françoise Helmbacher[b], Carlos Cardoso[a]

[a] INMED, INSERM UMR1249, Aix Marseille University, Parc Scientifique de Luminy, Marseille, France

[b] Aix Marseille Univ, CNRS, IBDM UMR 7288, Parc Scientifique de Luminy, Case 907, 13288 Marseille, France

ABSTRACT

The development of the mammalian cortex relies on the precise generation of the right number of neurons, their correct positioning within the cortical layers, and their maturation into functional cortical network. While the cadherin superfamily is known to mediate various processes during these developmental steps, the role of the atypical cadherin Fat1 remains unknown. In this study, we investigate the role of the atypical cadherin Fat1 in neuronal migration, maturation, and cortical lamination. To address this, we generated a *Fat1* knockdown model using *in-utero* electroporation combined with shRNA to deplete *Fat1* from cortical pyramidal neurons. Our results show that *Fat1* plays a role in the radial migration of newborn cortical neurons by regulating neuronal morphology during embryonic stages and modulating the formation of the apical dendritic trees. Moreover, using $Fat1^{flx/flx}$-$EMX1^{CRE}$ mice, we demonstrate that *Fat1* is essential for proper cortical lamination. Taken together, our study uncovers a previously uncharacterized role for *Fat1* in cortical development and provides evidence of its importance in neural circuit formation.

INTRODUCTION

The cerebral cortex is the seat of motor and cognitive functions and is composed of many neurons whose precise connectivity patterns support our advanced cognitive abilities (Molnár et al., 2019). Its formation relies on key developmental stages that ensure the production and proper positioning of neurons and establish appropriate network connectivity. After

neurogenesis begins, radial migration occurs in successive waves, allowing newly born neurons to move from the ventricular zone (VZ) toward the cortical plate (CP) (Rakic, 1972). Newborn neurons initiate radial migration by delaminating from the VZ to the subventricular zone (SVZ) (Noctor et al., 2004). They then stopped in the intermediate zone (IZ) and acquired a transient multipolar morphology (Noctor et al., 2004; Tabata & Nakajima, 2003). After this, neurons undergo the multipolar-to-bipolar transition and migrate, using radial glia (RGa) cells as a scaffold in a saltatory manner (Nadarajah et al., 2001). At the end of their migration, neurons undergo terminal translocation to settle in their destined cortical layer (Nadarajah et al., 2001). This process ensures that neurons are arranged locally according to their time of birth, forming cortical layers in an inside-out fashion (Rakic, 1972). The formation of the cortex relies on a precisely regulated spatial and temporal sequence involving numerous factors.

The atypical cadherin *FAT1* is a large transmembrane protein that contains 5 EGF-like domains, 1 laminin-G domain, and 34 cadherin repeats in its extracellular domain, *FAT1* also features a single transmembrane domain, and an intracellular domain (Cox et al., 2000; Dunne et al., 1995; Rock et al., 2005). *Fat1* mRNA is expressed in proliferative areas during cortical development (Badouel et al., 2015; Cox et al., 2000; Ponassi et al., 1999; Rock et al., 2005). Moreover, it has been established that *Fat1* plays a role in maintaining the balance between neuronal proliferation and differentiation *in vitro* (Ahmed et al., 2015). Furthermore, *Fat1* regulates the proliferation of radial precursors in the cortex *in vivo*, contributes to the maintenance of apical constriction alongside *Fat4*, and its loss leads to exencephaly in mouse embryos (Badouel et al., 2015). Despite these established functions, the specific role of *Fat1* in neuronal migration remains unknown. Recent findings have linked heterozygote compound mutation on *FAT1* to conditions such as partial (focal) epilepsy and/or febrile seizures (Zou et al., 2023) and autism spectrum disorder (Frei et al., 2021; Hernando-Davalillo et al., 2022; Youngs et al., 2012). These pathologies are typically linked to dysfunctional cortical networks, suggesting that *FAT1* may play an additional, yet undefined role during cortical development.

To address this issue, we depleted *Fat1* from a subset of upper-layer pyramidal neurons by time *in utero* electroporation (IUE) of shRNA against *Fat1* at E14.5. We demonstrated that the loss of *Fat1* transiently delayed the radial migration of newborn neurons during the embryonic stage but led to an over-migration at the postanal stage. *Fat1* depletion also induced an overgrowth of the apical dendritic tree. Moreover, using the conditional knockout model $Fat1^{flx/flx}$-$EMX1^{CRE}$, we determined that *Fat1* contributes to the cortical layer's establishment. Taken together, our findings reveal a novel role for *Fat1* in radial migration, dendritogenesis, and the establishment of cortical lamination, which are critical processes for the formation of functional neuronal connectivity.

MATERIAL AND METHODS

Mouse lines

Mice (*Mus musculus*) were group-housed (2-5 mice/cage) with same-sex littermates on a 12-hour light-dark cycle, with *ad libitum* access to food and water. Pregnant C57BL/6J mice were ordered from Janvier Labs (France) and delivered at least one week before *in utero* electroporation procedure. These mice were used to generate a *Fat1* knockdown model to study neuronal proliferation, migration, and maturation. The $Fat1^{flx/flx}$ mice, previously described by Caruso et al. (2013), were generously provided by Dr Françoise Helmbacher (IBDM, Aix-Marseille University, France) and maintained in our animal facility. Before and after the *in-utero* electroporation, pregnant mice were housed in individual cages with specific litter to avoid infection and irritation. For the analysis of cortical lamination, the $Fat1^{flx/flx}$ mice were bred with $EMX1^{CRE}$ mice (Gorski et al., 2002; JAX stock #005628). All animal experiments were conducted following European Communities Council Directives and approved by French ethical committees (Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale, Apafis #29902).

RNAi constructs

RNAi experiments were conducted using shRNA targeting the coding sequence: 5'-GCAGAGGTTCAACCTGAATCA-3' of *Mus musculus Fat1* mRNA (GenBank accession number: NM_001081286). BLAST searches against mouse databases confirmed the specificity of the target. As a negative control, we use a scrambled sequence: 5'-GTTCTCCGAACGTGTCACGT -3'. These constructs have been previously described (Badouel et al., 2015). The shRNAs were subcloned into a mU6pro vector (gift from Dr. J. LoTurco).

Validation of RNAi constructs

N2A cells were maintained at 37°C in a humidified 5% CO_2 incubator in DMEM supplemented with 10% Fetal Bovine Serum and 1X Glutamax. Cells were transfected with the lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Total RNA was isolated from N2A transfected 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 *Mus musculus FAT1* (primer pair 1: 5'-GCTGGGACTTTGACTACGAC-3' and 5'-GGCACTGTATGGCTGGGAGGT-3'; primer pair 2: 5'-CACATGATCGGCGTGATCT-3' and 5'-ACATCAAAGTGGCTGTCATAGTTGC-3') and *cyclophilinA* (Qiagen, QT00247709) as a control probe. Amplification was performed using SYBR-Green chemistry

(Roche diagnostics) and Roche amplification technology (Light Cycler 480). All experiments were performed in triplicate.

Western Blot analysis

Total brain or cortical tissues from mice were lysed in RIPA buffer solution (Thermo Scientific) supplemented with anti-protease and anti-phosphatase inhibitor cocktails (Thermo Scientific). Protein concentration was determined using the BCA assay (Thermo Scientific). Proteins (20 µg) were separated on a polyacrylamide gel (Novex 4–12% Tris-Glycine by Thermo Scientific) and transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Science). Primary antibodies were incubated overnight at 4 °C and included: Fat1 (1:500, Sigma Life science, #HPA001869) and Vinculin (1:1000, Invitrogen, #14-9777-82). Signals were detected using substrate HR Immobilon Western reagent (MerckMillipore), and bands were analyzed with ImageJ.

In utero Electroporation

Timed pregnant C57BL/6J or *Fat1*$^{flx/flx}$ mice (E14.5; 0 days post-conception was defined as the day of confirmation of sperm-positive vaginal plug) were injected with Buprenorphine (0.05 mg/kg) and Rimadyl (10 mg/Kg), and after 20 minutes anesthetized with isoflurane (5% for induction and 2.5% for surgery). The uterine horns were exposed. A volume of 1-1.5 µL of DNA plasmids (1 µg/µl pCAG-GFP either alone or with 1.5 µg/µl shRNA_Fat1 or 1.5 µg/µl shRNA_Scramble in C57BL/6J mice; 1 µg/µl pCAG-GFP and 1 µg/µl pCALNL-GFP with 1 µg/µl pCAG-CRE or 1 µg/µl pNEUROD1-CRE in Fat1$^{flx/flx}$ mice) combined with Fast Green (2mg / mL Sigma) was injected into the lateral ventricle of each embryo with a pulled glass capillary and a microinjector (Picospritzer II, General Valve Corporation, Fairfield, NJ, USA). Electroporation was then conducted by discharging a 4000 µF capacitor charged to 30 V E14.5, using a BTX ECM 830 electroporator (BTX Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Five electric pulses (5 ms duration) were delivered at 950 ms intervals using 5 mm electrodes placed on the head of the embryo across the uterine wall. Embryos were collected 2- and 4-days post-electroporation (at E16.5, E18.5) and postnatal stages (P2, P7). *In-utero* electroporation was performed in embryonic mice at E14.5, corresponding to an active period of radial glia proliferation and radial migration of newborn neurons of layer II-III in the cortex.

Histological and Immunological analyses

Mice brains were fixed (E16.5, E18.5) or perfused transcardially (P2, P7) with 4% paraformaldehyde and post-fixed overnight at 4°C in the same fixative. Coronal sections were cut at 100 µm thickness for all histological analyses, except for the lamination analyses (50

μm), using a vibratome (Leica). Free-floating slices were blocked and permeabilized for 2h in a blocking buffer composed of 10% Normal Goat Serum or Donkey serum, and 0.2% Triton X-100 (Sigma) in PBS. Primary antibodies, diluted in blocking solution and incubated overnight at 4 °C, were as follows: rabbit anti-FAT1 (1:500, Sigma-Aldrich, HPA001869), rabbit anti-PAX6 (1:200, Biolegend-Covance, sPRB-278P), rabbit anti-TBR2 (1:500, Abcam, ab23345), rabbit anti-Ki67 (1:250, Abcam, ab15580), rabbit anti-PH3 (1:500, Millipore, 06-750), goat anti-Nurr1 (1:100, R&D Systems, AF215665P), mouse anti-CSPG (1:100, Millipore-Sigma, C8035), mouse anti-Reelin (1:500, Millipore, mab5364), mouse anti-Satb2 (1:500, Abcam, ab51502), rabbit anti-caspase-3 (1:200, Cell Signalling, #9661), mouse anti-NeuN (1:200, Millipore, mab337), goat anti-Foxp2 (1:200, Santa-Cruz, sc-21069), rat anti-Ctip2 (1:500, Abcam, ab18465), mouse anti-RoRβ (1:200, Perseus Proteomics, PP-N7927-00), rabbit anti-CDP (1:500, Santa-Cruz, sc-13024), mouse anti-SST (1:50, Abcam, sc-55565), rabbit anti-PV (1:500, Abcam, ab11427), chicken anti-GFP (1:500, Aves, #GFP-1010). Corresponding fluorescently labelled secondary antibodies (AlexaFluor, Invitrogen) were added for 2h in a blocking solution at 4°C. Hoechst was diluted in PBS (1:1000) for 15 min at room temperature. Sections were mounted on microscope slides that were coversliped using Mowiol solution (Sigma).

Microscopy and Quantitative analyses

To analyze migration and lamination distribution, electroporated cortices were imaged as mosaics on a wide-field upright microscope equipped with a structured illumination system (Aptome 2, Zeiss) and a 10X objective with a z-stack covering the entire thickness of the electroporated cells to generate a maximum intensity projection (MIP). Cortical columns in the somatosensory cortex were cropped using Photoshop. The lower and upper limits of the cropped images were defined as the ventricle and pial surface at the embryonic stage, and the dorsal border of the corpus callosum and the pial surface at the postnatal stage. Each cortical column was divided into 20 bins of equal size spanning the cortical thickness using a custom-made algorithm in Fiji 2.15.1 software (Schindelin et al., 2012). Cells were quantified in each bin, and bin distribution was defined as the percentage of cells in each bin relative to the total number of cells.

To analyze co-localization in the case of cell identity, electroporated cortices were imaged using a confocal microscope (LSM800, Zeiss) with an oil-immersed X63 objective, with a 0.7 digital zoom and 10 stacks separated by 5.4μm z-steps. This setup allowed for the analysis of different z-stacks per slice. The analyses were performed in Fiji (Schindelin et al., 2012), where an ROI was applied to all slices to normalize and quantify the number of GFP+/STAB2+ cells in the cortex. For co-localization analyses of the cell death, electroporated cortices were imaged using

a microscope (Apotome 2, Zeiss) and a 20X objective with a z-stack covering the entire thickness of the electroporated cells to analyze 3 different stacks per animal. Cortical columns in the somatosensory cortex were cropped using Photoshop. The lower and upper limits of the cropped images were defined as the ventricle and pial surface. Each cortical column was divided into 20 bins of equal size spanning the cortical thickness using a custom-made algorithm in Fiji 2.15.1 software (Schindelin et al., 2012). Cells were quantified in each bin, and bin distribution was defined as the percentage of cells in each bin relative to the total number of cells.

For cell orientation analyses, the electroporated cortex was imaged using a confocal microscope (LSM800, Zeiss) with an oil-immersed X63 objective, with a 0.7 digital zoom and a stack covering the entire thickness of the slice separated by 3µm z-steps. We estimated the number of cells oriented between 0-45° and 45-90° in a defined area within the IZ and the VZ/SVZ using Fiji 2.15.1 software (Schindelin et al., 2012).

For cell morphological parameters analyses, electroporated cortices were imaged using a confocal microscope (LSM800, Zeiss) with an oil-immersed X40 and X63 (with a 0.5 digital zoom) objective was used, and a stack covering an entire neuron separated by 0.2 or 0.1µm z-steps. To extract the cell's circularity and area at E16.5, segmentation of electroporated cells was performed using Cellpose 3.0.5 (Stringer et al., 2021; Stringer & Pachitariu, 2024), and circularity and area were obtained using the vantage tools of the Imaris Software (Oxford Instruments). For neuronal morphology at E18.5 and P7, reconstruction was performed on Neurolucida 360 software (MBF Bioscience), and morphological features were extracted using Neurolucida Explorer software (MBF Bioscience).

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0.2 for Windows (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, www.graphpad.com). Details of the statistical test applied are provided in the figure legends. Data are presented as mean ±SEM. The normality of the data distribution was assessed using Shapiro-Wilk's normality test. For comparison between two independent groups with normally distributed data with the same standard deviation (SD), a two-tailed Student's t-test was used, in the case of no SD equivalence, a two-tailed Welch's t-test was used. The Mann-Whitney test was applied if the data did not follow a normal distribution. For comparisons between three or two independent groups of normally distributed data, a One-Way ANOVA, characterizing the interactions between factors (animal and bin) with γ, followed by Bonferroni's post-hoc test.

RESULTS

1. *Fat1* is expressed among the developing mice brain

To characterize the temporal expression of *Fat1* in the mouse neocortex, we used the single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq) dataset from the Broad Institute, which covers the entire period of corticogenesis from E10,5 to P4 of the mouse somatosensory cortex (https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell ; Di Bella et al., 2021). This database showed gene expression in specific cell types at various developmental stages (Fig. 1. A). The scRNA-seq data revealed that *Fat1* mRNA is expressed early and consistently across all embryonic (E10-E18) and post-natal (P1-P2) stages, with an enrichment observed at E10, E12 and E18 and P1 (Fig. 1. B). *Fat1* is mainly expressed in apical and intermediate progenitors (AP; IP), in Cajal Retzius cell (CR), migrating neurons, layer IV, and interneurons (Fig. 1. B). To further emphasize its presence in neuronal progenitor during early embryonic stages, we employed another scRNA-seq dataset that captures dynamic gene expression over time (for E12 to E15) and across cell types (RGa, IP, and 4-days-old-neurons) (https://genebrowser.unige.ch/telagirdon/ ; Telley et al., 2019). *Fat1* is highly expressed in the AP throughout all embryonic stages, with partial expression in post-mitotic neurons (Fig. 1. C). Then, we wanted to assess the expression of Fat1 throughout the embryonic and post-natal stages by using the scRNA-seq database from Mathieu et al., (2024). *Fat1* is specifically expressed in Cajal-Retzius (CR) cells, with low levels at E18.5 but increasing postnatally. It is also detected in Car3 Claustrum-like neurons in layer VI, in L4/5 IT, L5 IT neurons, and two interneuron subtypes: Lamp5 and in SST and parvalbumin (Supplementary Fig. 1). Next, we wanted to quantify Fat1 protein levels through Western Blot across embryonic (whole brain sample) and postnatal stages (cortex sample). Fat1 is consistently expressed during corticogenesis, with increased levels at E18 and P2 (Fig. 1.D). Furthermore, we investigated Fat1 protein expression during cortical development using immunostaining. Our results showed that the Fat1 protein is ubiquitously expressed at different embryonic stages, with stronger expression in the ventricular and subventricular zones (VZ/SVZ), the subplate (SP), and the marginal zone, where the CR cells reside (Fig. 1. E). Fat1 co-expressed in SP and Cajal-Retzius cells, two critical regions and cell types involved in the establishment of cortical architecture (Supplementary Fig. 2). In summary, these data suggest that *Fat1* is strongly expressed during embryonic stages of cortical development, potentially playing a key role in neuronal progenitor function and cortical structure formation.

2. *Fat1* knockdown disrupts embryonic neuronal proliferation, migration, and newly born neuron morphology

To determine the role of *Fat1* during the early embryonic stages, we used IUE to knockdown *Fat1* (*Fat1*^{KD}) in the developing cortex. The *Fat1* shRNA was previously described (Badouel et al, 2015), and we confirmed in cell culture by RT-qPCR that it reduced *Fat1* mRNA expression by approximately 80% (Supplementary Fig. 3). IUE was performed at E14.5, an embryonic stage when *Fat1* is expressed in the AP (Fig 1. B-C). *Fat1* shRNA was co-electroporated with an EGFP expression vector transfected in AP in the VZ and embryonic brains were collected 2 days post-IUE. Quantification of EGFP-positive cells on the cortical column showed that *Fat1*^{KD} resulted in mislocalized EGFP-positive cells, with fewer cells entering the CP compared to the control electroporated brain (Figure. 2. A). The *Fat1*^{KD} cell remains beneath the SP and cannot enter the CP (Supplementary Fig. 4). Then, we wanted to determine whether this mislocalization could result from a disruption of radial glial integrity, altered proliferation, or incorrect orientation and morphology of newborn neurons. Using the RGa marker vimentin, we concluded that RGa integrity was preserved, indicating that migration delays were not due to delamination of RGa (Supplementary Fig. 5). Next, we aimed to quantify whether *Fat1*^{KD} affects the proliferation. To do so, we performed immunostaining of RGa using the Pax6 marker, the IP using the Tbr2 marker, and cell cycle markers Ki67 and Ph3. *Fat1*^{KD} led to an increased ratio of Pax6^{+}/GFP^{+}-positive cells and Tbr2^{+}/GFP^{+}-positive cells (Supplementary Fig. 6. A-B). However, no significant difference was observed in the number of Ki67^{+}/GFP^{+}-positive and Ph3^{+}/GFP^{+}-positive cells (Supplementary Fig. 6. C-D). We did not observe any significant changes in the positioning of these cells within the IZ (Supplementary Fig. 6). Our results are consistent with the findings of Badouel & al. (2015) regarding the increase in neuronal precursors. However, we did not observe any mislocalization of cells within the IZ nor an increase in the number of cells in the cell cycle. Overall, these findings suggest that *Fat1*^{KD} slightly affects the proliferation process by increasing the number of neuronal precursors without altering their position. Then, we wanted to determine whether the mislocalization of cells could result from misorientation or altered morphology of newly born neurons. To do so, we examined whether cells localized in the VZ/SVZ or IZ exhibited altered orientation. Our results showed a significantly higher percentage of non-radially oriented *Fat1*^{KD} cells with round morphology in the VZ/SVZ compared to control cells (Figure 2. B). However, no significant difference in orientation was observed between the control and the *Fat1*^{KD} conditions in the IZ (Figure 2. C). We then aimed to assess whether cells were unable to reach the CP due to an impaired bipolar-to-multipolar transition by analyzing the circularity of post-mitotic neurons (Runge et al., 2021). At E16.5, our observations revealed

that in deep IZ, *Fat1*^{KD} cells were less circular compared to controls, although there was no difference in cell area (Figure 2.D). In contrast, in the upper IZ, the *Fat1*^{KD} cells were larger than the controls but showed no morphological alterations. This result suggests that in early embryonic stages, *Fat1* is required for the orientation of newly born neurons in the SVZ/VZ but also the acquisition of a circular morphology. Thus, *Fat1*^{KD} increased the number of neuronal precursors and delayed the radial migration of newborn neurons. This delay is accompanied by an increase in misorientated cells in the VZ/SVZ at E16.5 and a delay in the acquisition of a circular morphology in the deep IZ. Overall, *Fat1* appears to play a role in maintaining the apico-basal polarity of newly born neurons during early embryonic stages, as well as a possible retarded multi-to-bipolar transition in the deep IZ that may affect the radial migration.

3. *Fat1* knockdown alters the morphology of newly born neurons in the IZ

To determine whether the alteration in radial migration persists at later embryonic stages, we examined the cortex at a more advanced stage of development. *Fat1* shRNA was co-electroporated with an EGFP expression vector, and embryonic brains were collected 3 days post-IUE. At E17.5 Quantification of EGFP-positive cells on the cortical column revealed that *Fat1*^{KD} resulted in mislocalized EGFP-positive cells (Figure 3. A). The phenotype was more pronounced compared to E16.5 (Figure 2. A), with a significant increase of cells remaining stuck in the IZ accompanied by significantly less amount unable to reach the CP compared to control electroporated brains (Figure. 3. A). Then, we wanted to further investigate the morphology of neurons in the IZ by dividing it into three regions the deep, the middle, and the upper IZ, to assess whether the circularity alterations were maintained and if they varied by IZ subregions. Our results showed that *Fat1*^{KD} cells exhibited an increased area across all regions of the IZ (Figure 3. B-D). We observed that *Fat1*^{KD} cells in the deep IZ no longer displayed circular differences with the control group (Figure 3. B) that we observed at E16.5 (Figure 2. B). However, in the middle and the upper IZ, there was a significant increase in the proportion of *Fat1*^{KD} neurons with circular morphology compared to the control (Figure 3. C-D). Overall, these data suggest that *Fat1*^{KD} may lead to a retarded multi-bipolar transition of newly born neurons in the IZ.

4. *Fat1* knockdown disrupts cell survival without affecting terminal identity acquisition

We next assessed whether the migration delay observed with *Fat1*^{KD} impairs the acquisition of terminal identity at later stages. To do so, we performed IUE at 14.5 we targeted the pyramidal neurons of upper layers and we wanted to investigate if mislocalized neurons at E18.5 had already acquired their terminal identity by using the Satb2 marker. First, we observed that the migration delays persisted at a later stage, *Fat1*^{KD} cells were predominantly stuck in the IZ compared to control cells that successfully migrated to the CP (Figure 4. A). Moreover, the cells that remain in the IZ were positioned below the SP (Supplementary 4). Next, we explored whether the cells that did reach the CP exhibited altered morphology that could explain their inability to fully migrate. We quantified the number of leading processes but found no significant differences between *Fat1*^{KD} and control cells (Supplementary 7). To determine whether the neurons remaining in the IZ had acquired their terminal identity, we stained the sections with the post-mitotic determinant for upper layer neurons, Satb2, and quantified their position within the cortex. Our results showed that *Fat1*^{KD} Satb2^{+}/GFP^{+} cells remaining in the IZ had already acquired their terminal identity (Figure 4. B). In contrast, the few EGFP-positive control cells found in the IZ (Figure 4. A) had not yet differentiated, while the cell in the CP had fully acquired their terminal identity (Figure 4. B). To investigate whether the increase in radial precursor maintenance was accompanied by a concomitant decrease in neuronal differentiation, we quantified the density of Satb2^{+} post-mitotic determinant for upper-layer neurons. *Fat1*^{KD} resulted in a significant reduction in Satb2^{+} cell density across the cortical columns (Figure 4. C). These findings indicate that while *Fat1*^{KD} does not impair terminal identity acquisition, it does reduce the proportion of differentiated neurons in the cortex. Then, we wanted to investigate if the reduction in post-mitotic upper-layer neuron density was related to increased apoptosis. Immunostaining for Caspase3, a marker of cell death, revealed that *Fat1*^{KD} cells do co-localize with this marker at E18.5 (Figure 4.D). Quantitative analysis showed a significant increase in Caspase3^{+}GFP^{+} cell density in the *Fat1*^{KD} condition compared to control (Figure 4. E). Subsequently, we show that this increase in cell death occurred predominantly in the IZ and the CP, despite the small number of neurons that reached the CP (Figure 4. F). Taken together, our results indicate that although *Fat1*^{KD} does not affect the acquisition of upper-layer identity, it significantly reduces the overall cell population through increased apoptosis. Thus, *Fat1* appears to play a critical role in both neuronal migration and in the proper maintenance of neuronal survival during cortical development.

5. *Fat1* knockdown led to over-migration and impaired neuronal maturation at the postnatal stage

Then, we wanted to determine if the radial migration delays persisted postnatally. We performed IUE at E14.5, targeting the upper-layer II-III neurons, and collected brains postnatal days 2 (P2) and 7 (P7). Interestingly, quantification of EGFP-positive cells along the cortical column revealed that *Fat1*^{KD} neurons slightly over-migrate toward the CP compared to control neurons at P2 (Figure 5. A). We found that *Fat1*^{KD} neurons within layers II-III, marked by CDP, were positioned closer to the MZ compared to control neurons (Figure 5. B). At P7, the over-migration phenotype of *Fat1*^{KD} neurons was even more pronounced compared to the control condition (Figure 6. A). *Fat1*^{KD} neurons localized predominantly at the top of layers II-III, while control neurons were distributed at the bottom of layers with a small amount overlapping layer IV (Figure 6. B-C). Together, these results demonstrate that *Fat1*^{KD} induces a transient migration delay during embryonic stages, followed by over-migration of neurons during the postnatal period. Overall, *Fat1* plays a key role in the radial migration of newly born neurons during cortical development.

Moreover, alterations in the final positioning of neurons are often associated with changes in the morphology of mature neurons. To assess this, we analyzed the dendritic tree at P7 (Figure 6. D). First, we found that *Fat1*^{KD} neurons exhibited a smaller soma area compared to the control group (Figure 6. E). Our results showed that the number and length of apical dendrites were significantly increased in the *Fat1*^{KD} neurons compared to controls (Figure 6. F-G). However, there were no significant differences in the number or length of basal dendrites (Figure 6. H-I). Overall, the total number of dendrites and their combined length did not differ significantly between *Fat1*^{KD} and the control neurons (Figure 6. J-K). These findings suggest that *Fat1* has a role in the apical dendritic tree development of pyramidal neurons.

6. Fat1 deletion in excitatory neurons disrupts the cortical lamination

After demonstrating that *Fat1* regulates radial migration, we wanted to decipher its role in cortical lamination. To do so, we generate a *Fat1*$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} mouse model, allowing us to study the impact of *Fat1* depletion specifically in excitatory cortical neurons. We first examined whether the depletion of *FAT1* in the Fat1$^{flx/flx}$ model recapitulates the migration phenotype observed in the *Fat1*^{KD} model at E18.5 and P2. To assess this, we injected p.CAG-GFP (*Fat1*$^{flx/flx}$) or p.CALNL-GFP combined with p.CAG-Cre (*Fat1*$^{cKO\text{-}GAG\text{-}CRE}$) or p.NeuroD1-Cre (*Fat1*$^{cKO\text{-}NeuroD1\text{-}CRE}$) at E14.5 and quantified the position of EGFP-positive within the cortex.

Our result showed that at E18.5, EGFP-positive cells in *Fat1*$^{cKO\text{-}GAG\text{-}CRE}$ mice were mislocalized, with a lower proportion of cells reaching the CP compared to control *Fat1*$^{flx/flx}$ mice (Supplementary 8. A). Such defect was completely abolished when we depleted *Fat1* in post-mitotic neurons in the *Fat1*$^{cKO\text{-}NeuroD1\text{-}CRE}$ model (Supplementary 8. C). At P2, *Fat1*$^{cKO\text{-}GAG\text{-}CRE}$ and Fat*1*$^{cKO\text{-}NeuroD1\text{-}CRE}$ neurons exhibited abnormal final positioning compared to *Fat1*$^{flx/flx}$ neurons (Supplementary 8. B-D). These findings confirm that the *Fat1*^{cKO} model recapitulates the migration phenotype observed in our *Fat1*^{KD} model, alongside altered final neuronal positioning.

Next, we investigated the involvement of *Fat1* in cortical layer formation using the *Fat1*$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} mode. First, we quantified the thickness of the somatosensory cortex and observed that it was significantly increased in the *Fat1*$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} compared to controls (Figure 7. A). Analysis of neuronal lamination using the NeuN marker revealed a distribution shift towards the cortical surface, no difference in cell density was observed (Figure 7. B, data not shown). Given the over-migration phenotype observed in our *Fat1*^{KD} model, we examined the positioning and density of cortical layers using Ctip2 (layers VI and V), RoRβ (layer IV), and CDP (layer IV and layer II-III) markers. We found that layers VI-V in the *Fat1*$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} mice were shifted towards the cortical surface (Figure 7. C), along with an increase in Ctip2^{+} cell density compared to controls (Figure 7. F). Similarly, layer IV was displaced upwards in the Fat1$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} cortex (Figure 7.D) and exhibited an increase of RoRβ^{+} cell density (Figure 7. G). The upper layers (II-III) also showed a shift towards the cortical surface in the Fat1$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} model (Figure 7. E) but without any significant change in cell density (Figure 7. H). However, the lamination shift we observed is not due to an increase in cortical layer thickness (Supplementary 9). We also examined the effect of *Fat1* depletion in excitatory neurons on the positioning of interneurons. Our results showed that PV^{+} interneurons in the Fat1$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} cortex were shifted towards the cortical surface (Supplementary 10. A), while no changes were observed in the distribution of SST^{+} interneurons (Supplementary 10. C). However, no significant differences in PV^{+} and SST^{+} interneuron density were detected (Supplementary 10. B-D). In conclusion, *Fat1* plays a critical role in cortical layer establishment and regulate the overall thickness of the somatosensory cortex.

DISCUSSION

In this study, we provided an uncharacterized role of the atypical cadherin *Fat1* in cortical development. First, we demonstrated that the loss of *Fat1* delays the embryonic radial migration by disrupting neuronal orientation in the VZ/SVZ and delaying the acquisition of a circular morphology in the IZ. We found that *Fat1* does not impact the acquisition of terminal identity but enhances cell death. The embryonic migration delay is transitory, at the postnatal stage, we showed that *Fat1* depletion results in neuronal over-migration accompanied by an abnormal overgrowth of the apical dendritic tree. Furthermore, *Fat1* affects the lamination of the somatosensory cortex.

The radial migration of newborn neurons is a fundamental process that allows the proper final positioning of the cells within the cortex (Nadarajah et al., 2001; Rakic, 1972). In our study, we demonstrated that *Fat1* ^{KD} delays neuronal radial migration during embryonic development. Moreover, we found that *Fat1* ^{KD} disrupted the polarity of newly born neurons in the VSZ/VZ, which exhibited a rounded morphology. *Fat1* ^{KD} cells in the IZ also showed a delay in acquiring the circular morphology typical of multipolar cells. These findings suggest that alterations in polarity and the multi-bipolar transition might contribute to the observed radial migration defects. Further studies are needed to determine whether the migration delays in *Fat1* ^{KD} cells is directly linked to these processes. Ideally, live imaging studies will provide deeper insights into these disruptions and enable a more accurate characterization of the multipolar and bipolar cells within the IZ. We provide new insights into the role of *Fat1*, although the mechanisms underlying these processes remain unknown. However, some interactions may help explain this phenomenon. First, *Fat1* can bind to Ena/Vasp through its intracellular domain, a complex that modulates the actin cytoskeleton (Moeller et al., 2004; Tanoue & Takeichi, 2004). The importance of actin dynamics and rearrangement during neuronal migration is well established. Ena/Vasp has been implicated in modulating the formation and dynamics of multipolar neurons during the embryonic stage (Yoshinaga et al., 2012). Inactivation of this complex leads to neuronal over-migration at the postnatal stage, showing that this complex participates in the regulation of cortical neuronal positioning (Goh et al., 2002). Thus, it is possible that the interaction between *Fat1* and the Ena/Vasp complex mediates the radial migration of newly born neurons and allows their placement among the proper cortical layer. Additionally, *Fat1* has been shown to bind to GPC3 in hepatocellular carcinoma cells (HCC) through its C-terminal extremity (Meng et al., 2021). This interaction regulates the migration of HCC (Meng et al., 2021). Recently, the receptor-ligand pair GPC3-UNC5 has been implicated in regulating migration processes (Akkermans et al., 2022). Therefore, it is plausible that the interaction between *Fat1* and GPC3 also contributes to the regulation of radial migration in neurons.

Our results indicate that the migration delay is transitory and leads to over-migration during the postnatal stage in our *Fat1* ^{KD} model. This over-migration may be linked to a deficiency in the capacity of neurons to undergo terminal translocation to position themselves correctly within the cortical layers. One possible explanation is that *Fat1* could do homophilic interactions like cadherin often does (Boggon et al., 2002). At the end of the locomotion, the leading processes of the migrating neurons establish contact with the CR in the MZ (Gil-Sanz et al., 2013). It has been shown that the CR can interact with migrating neurons through homophilic interaction involving the cadherin CDH2, facilitating terminal translocation (Gil-Sanz et al., 2013). Since *Fat1* is expressed in both CR cells and migrating neurons and is localized at the filopodia tips and the lamellipodial edges of cells (Tanoue & Takeichi, 2004), migrating neurons may contact CR via homophilic *Fat1* interactions to mediate terminal translocation.

Disruption of neuronal migration is often linked to alteration in neuronal morphology. The establishment of a proper dendritic tree is critical for neuronal function and the formation of network connectivity. Our results suggest that *Fat1* participates in the establishment of the apical dendritic tree. In our model *Fat1* ^{KD}, the number as well as the length of the apical dendritic tree is increased, these rearrangements could potentially impact the intrinsic properties of neurons located within the cortex. Such phenotypes have already been associated with other cases of neuronal migration defects impacting the morphological proprieties (Falace et al., 2014; Falace et al., 2024) but can also impact the functional proprieties of neurons (Cappello et al., 2013; Matteo et al., 2024; Runge & al., 2021). Further studies will be necessary to determine the impact of the dendritic rearrangement on neuronal properties, as well as the establishment of cortical networks.

Dysregulation of neuronal migration and alterations in neuronal positioning are often associated with neurodevelopmental disorders (Klingler et al., 2021). In the literature, *Fat1* has already been linked to epilepsy and autism (Frei et al., 2021; Hernando-Davalillo et al., 2022; Zou et al., 2024). Our observation across various models may contribute to a better understanding of the mechanisms underlying these neurodevelopmental diseases. Specifically, the alteration of neuronal morphology in *Fat1* ^{KD} neurons could be linked to disruption of the morpho-functional properties of neurons and could be related to epilepsy. Spontaneous epilepsy seizures have already been observed in our mouse model (personal communication). Further investigations into neuronal properties, alongside the characterization of seizure in these models, could improve the understanding of the role of *Fat1* in epilepsy. Additionally, cortical lamination defects have been linked to autism in the literature (Runge et al., 2021), further investigation into animal comportment can link this mouse model to autism. Moreover, the atypical cadherin receptor-ligand pair Fat4-Dchs1 has been associated with periventricular nodular heterotopia (PVNH), a pathology tied to neuronal migration defects (Cappello et al., 2013). *Fat4-Dchs1* is

known to regulate both migration and the morpho-functional properties of cortical neurons (Cappello et al., 2013; Matteo et al., 2024). The effects of *Fat1* depletion raise several new hypotheses about its potential involvement in neurodevelopmental diseases.

In summary, we provide new insights into the role of *Fat1* during cortical development, particularly in the radial migration and the establishment of the dendritic tree. Altogether, these findings provide evidence of the importance of cellular adhesion proteins mediating cortical development. However, further studies on the molecular and cellular mechanism mediated by *Fat1* may provide deeper insights into the functions of this atypical cadherin as well as its involvement in neuropathological disorders.

BIBLIOGRAPHY

Ahmed, A. F., Bock, C. E. De, Lincz, L. F., Pundavela, J., & Zouikr, I. (2015). FAT1 cadherin acts upstream of Hippo signalling through TAZ to regulate neuronal differentiation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(23), 4653–4669. https://doi.org/10.1007/s00018-015-1955-6

Akkermans, O., Delloye-Bourgeois, C., Peregrina, C., Carrasquero-Ordaz, M., Kokolaki, M., Berbeira-Santana, M., Chavent, M., Reynaud, F., Raj, R., Agirre, J., Aksu, M., White, E. S., Lowe, E., Ben Amar, D., Zaballa, S., Huo, J., Pakos, I., McCubbin, P. T. N., Comoletti, D., … Seiradake, E. (2022). GPC3-Unc5 receptor complex structure and role in cell migration. *Cell*, *185*(21), 3931-3949.e26. https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.09.025

Badouel, C., Zander, M. A., Liscio, N., Bagherie-Lachidan, M., Sopko, R., Coyaud, E., Raught, B., Miller, F. D., & McNeill, H. (2015). Fat1 interacts with Fat4 to regulate neural tube closure, neural progenitor proliferation and apical constriction during mouse brain development. *Development (Cambridge)*, *142*(16), 2781–2791. https://doi.org/10.1242/dev.123539

Boggon, T. J., Murray, J., Chappuis-flament, S., Wong, E., Barry, M., Boggon, T. J., Murray, J., & Chappuis-flament, S. (2002). *C-Cadherin Ectodomain Structure and Implications for Cell Adhesion Mechanisms*. *296*(5571), 1308–1313.

Brasch, J., Harrison, O. J., Honig, B., & Shapiro, L. (2012). Thinking outside the cell: How cadherins drive adhesion. *Trends in Cell Biology*, *22*(6), 299–310. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.03.004

Cappello, S., Gray, M. J., Badouel, C., Lange, S., Einsiedler, M., Srour, M., Chitayat, D., Hamdan, F. F., Jenkins, Z. A., Morgan, T., Preitner, N., Uster, T., Thomas, J., Shannon, P., Morrison, V., Di Donato, N., Van Maldergem, L., Neuhann, T., Newbury-Ecob, R., … Robertson, S. P. (2013). Mutations in genes encoding the cadherin receptor-ligand pair DCHS1 and FAT4 disrupt cerebral cortical development. *Nature Genetics*, *45*(11), 1300–1310. https://doi.org/10.1038/ng.2765

Caruso, N., Herberth, B., Bartoli, M., Puppo, F., Dumonceaux, J., Zimmermann, A., Denadai, S., Lebossé, M., Roche, S., Geng, L., Magdinier, F., Attarian, S., Bernard, R., Maina, F., Levy, N., & Helmbacher, F. (2013). Deregulation of the Protocadherin Gene FAT1 Alters Muscle Shapes: Implications for the Pathogenesis of Facioscapulohumeral Dystrophy. *PLoS Genetics*, *9*(6). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003550

Cox, B., Hadjantonakis, A. K., Collins, J. E., & Magee, A. I. (2000). Cloning and expression throughout mouse development of mfat1, a homologue of the Drosophila tumour suppressor gene fat. *Developmental Dynamics*, *217*(3), 233–240. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(200003)217:3<233::AID-DVDY1>3.0.CO;2-O

Di Bella, D. J., Habibi, E., Stickels, R. R., Scalia, G., Brown, J., Yadollahpour, P., Yang, S. M., Abbate, C., Biancalani, T., Macosko, E. Z., Chen, F., Regev, A., & Arlotta, P. (2021). Molecular logic of cellular diversification in the mouse cerebral cortex. *Nature*, *595*(7868), 554–559. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03670-5

Dunne, J., Hanby, A. M., Poulsom, R., Jones, T. A., Sheer, D., Chin, W. G., Ming Da, S., Zhao, Q., Beverley, P. C. L., & Owen, M. J. (1995). Molecular cloning and tissue expression of FAT, the human homologue of the drosophila fat gene that is located on chromosome 4q34-q35 and encodes a putative adhesion molecule. *Genomics*, *30*(2), 207–223. https://doi.org/10.1006/geno.1995.9884

Falace, A., Buhler, E., Fadda, M., Watrin, F., Lippiello, P., Pallesi-Pocachard, E., Baldelli, P., Benfenati, F., Zara, F., Represa, A., Fassio, A., & Cardoso, C. (2014). TBC1D24 regulates neuronal migration and maturation through modulation of the ARF6-dependent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(6), 2337–2342. https://doi.org/10.1073/pnas.1316294111

Falace, A., Corbieres, L., Palminha, C., Guarnieri, F. C., Schaller, F., Buhler, E., Tuccari di San Carlo, C., Montheil, A., Watrin, F., Manent, J. B., Represa, A., de Chevigny, A., Pallesi-

Pocachard, E., & Cardoso, C. (2024). FLNA regulates neuronal maturation by modulating RAC1-Cofilin activity in the developing cortex. *Neurobiology of Disease*, *198*(July 2023), 106558. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2024.106558

Frei, J. A., Brandenburg, C. J., Nestor, J. E., Hodzic, D. M., Plachez, C., McNeill, H., Dykxhoorn, D. M., Nestor, M. W., Blatt, G. J., & Lin, Y.-C. (2021). Postnatal expression profiles of atypical cadherin FAT1 suggest its role in autism. *Biology Open*, *10*(6), 1–10. https://doi.org/10.1242/bio.056457

Gil-Sanz, C., Franco, S. J., Martinez-Garay, I., Espinosa, A., Harkins-Perry, S., & Müller, U. (2013). Cajal-Retzius cells instruct neuronal migration by coincidence signaling between secreted and contact-dependent guidance cues. *Neuron*, *79*(3), 461–477. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.06.040

Goh, K. L., Cai, L., Cepko, C. L., & Gertler, F. B. (2002). Ena/VASP proteins regulate cortical neuronal positioning. *Current Biology*, *12*(7), 565–569. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00725-X

Gorski, J. A., Talley, T., Qiu, M., Puelles, L., Rubenstein, J. L. R., & Jones, K. R. (2002). Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *Journal of Neuroscience*, *22*(15), 6309–6314. https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-15-06309.2002

Gul, I. S., Hulpiau, P., Saeys, Y., & van Roy, F. (2017). Evolution and diversity of cadherins and catenins. *Experimental Cell Research*, *358*(1), 3–9. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.001

Hernando-Davalillo, C., Martín, A. A. S., Borregan Prats, M., & Ortigoza-Escobar, J. D. (2022). De novo 4q35.2 duplication containing FAT1 is associated with autism spectrum disorder. *Clinical Genetics*, *July*, 4–7. https://doi.org/10.1111/cge.14194

Klingler, E., Francis, F., Jabaudon, D., & Cappello, S. (2021). Mapping the molecular and cellular complexity of cortical malformations. *Science*, *371*(6527). https://doi.org/10.1126/science.aba4517

Matteo, F. Di, Bonrath, R., Schmidt, H., Martin, A. C. A., Pravata, V., Giaimo, R. Di, Menegaz, D., Riesenberg, S., Vrij, F. M. S. de, Maccarrone, G., Holzapfel, M., Straub, T., Kushner, S. A., Robertson, S. P., Eder, M., & Cappello, S. (2024). Neuronal Hyperactivity in Neurons Derived from Individuals with Grey Matter Heterotopia. *BioRxiv*, 2024.07.10.602948. https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.07.10.602948v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.07.10.602948v1.abstract

Meng, P., Zhang, Y. F., Zhang, W., Chen, X., Xu, T., Hu, S., Liang, X., Feng, M., Yang, X., & Ho, M. (2021). Identification of the atypical cadherin FAT1 as a novel glypican-3 interacting protein in liver cancer cells. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-020-79524-3

Moeller, M. J., Soofi, A., Braun, G. S., Li, X., Watzl, G., Kriz, W., & Holzman, L. B. (2004). Protocadherin FAT1 binds Ena/VASP proteins and is necessary for actin dynamics and cell polarization. *EMBO Journal*, *23*(19), 3769–3779. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600380

Molnár, Z., Clowry, G. J., Šestan, N., Alzu'bi, A., Bakken, T., Hevner, R. F., Hüppi, P. S., Kostović, I., Rakic, P., Anton, E. S., Edwards, D., Garcez, P., Hoerder-Suabedissen, A., & Kriegstein, A. (2019). New insights into the development of the human cerebral cortex. *Journal of Anatomy*, *235*(3), 432–451. https://doi.org/10.1111/joa.13055

Nadarajah, B., Brunstrom, J. E., Grutzendler, J., Wong, R. O. L., & Pearlman, A. L. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nature Neuroscience*, *4*(2), 143–150. https://doi.org/10.1038/83967

Noctor, S. C., Martinez-Cerdeño, V., Ivic, L., & Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature Neuroscience*, *7*(2), 136–144. https://doi.org/10.1038/nn1172

Nollet, F., Kools, P., & Van Roy, F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *Journal of Molecular Biology*, *299*(3), 551–572. https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3777

Ponassi, M., Jacques, T. S., Ciani, L., & Ffrench-Constant, C. (1999). Expression of the rat homologue of the Drosophila fat tumour suppressor gene. *Mechanisms of Development*, *80*(2), 207–212. https://doi.org/10.1016/S0925-4773(98)00217-2

Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *Journal of Comparative Neurology*, *145*(1), 61–83. https://doi.org/10.1002/cne.901450105

Rock, R., Schrauth, S., & Gessler, M. (2005). Expression of mouse dchs1, fjx1, and fat-j suggests conservation of the planar cell polarity pathway identified in Drosophila. *Developmental Dynamics*, *234*(3), 747–755. https://doi.org/10.1002/dvdy.20515

Runge, K., Mathieu, R., Bugeon, S., Lafi, S., Beurrier, C., Sahu, S., Schaller, F., Loubat, A., Herault, L., Gaillard, S., Pallesi-Pocachard, E., Montheil, A., Bosio, A., Rosenfeld, J. A., Hudson, E., Lindstrom, K., Mercimek-Andrews, S., Jeffries, L., van Haeringen, A., … de Chevigny, A. (2021). Disruption of NEUROD2 causes a neurodevelopmental syndrome with autistic features via cell-autonomous defects in forebrain glutamatergic neurons. *Molecular Psychiatry*, *May*. https://doi.org/10.1038/s41380-021-01179-x

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. https://doi.org/10.1038/nmeth.2019

Sharma, P., & McNeill, H. (2013). Fat and Dachsous Cadherins. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 116). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00010-8

Stringer, C., & Pachitariu, M. (2024). Cellpose3: one-click image restoration for improved cellular segmentation. *BioRxiv*, 2024.02.10.579780. https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.02.10.579780v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.02.10.579780v1.abstract

Stringer, C., Wang, T., Michaelos, M., & Pachitariu, M. (2021). Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nature Methods*, *18*(1), 100–106. https://doi.org/10.1038/s41592-020-01018-x

Tabata, H., & Nakajima, K. (2003). Multipolar Migration: The Third Mode of Radial Neuronal Migration in the Developing Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience*, *23*(31), 9996–10001. https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-31-09996.2003

Tanoue, T., & Takeichi, M. (2004). Mammalian Fat1 cadherin regulates actin dynamics and cell-cell contact. *Journal of Cell Biology*, *165*(4), 517–528. https://doi.org/10.1083/jcb.200403006

Telley, L., Agirman, G., Prados, J., Amberg, N., Fièvre, S., Oberst, P., Bartolini, G., Vitali, I., Cadilhac, C., Hippenmeyer, S., Nguyen, L., Dayer, A., & Jabaudon, D. (2019). Temporal patterning of apical progenitors and their daughter neurons in the developing neocortex. *Science*, *364*(6440). https://doi.org/10.1126/science.aav2522

Yoshinaga, S., Ohkubo, T., Sasaki, S., Nuriya, M., Ogawa, Y., Yasui, M., Tabata, H., & Nakajima, K. (2012). A phosphatidylinositol lipids system, lamellipodin, and Ena/VASP regulate dynamic morphology of multipolar migrating cells in the developing cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*, *32*(34), 11643–11656. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0738-12.2012

Youngs, E. L., Henkhaus, R. S., Hellings, J. A., & Butler, M. G. (2012). 12-year-old boy with a 4q35.2 microdeletion and involvement of MTNR1A, FAT1, and F11 genes. *Clinical Dysmorphology*, *21*(2), 93–96. https://doi.org/10.1097/mcd.0b013e32834e9216

Zou, D. F., Li, X. Y., Lu, X. G., Wang, H. L., Song, W., Zhang, M. W., Liu, X. R., Li, B. M., Liao, J. X., Zhong, J. M., Meng, H., & Li, B. (2023). Association of FAT1 with focal

epilepsy and correlation between seizure relapse and gene expression stage. *Seizure*, *February*. https://doi.org/10.1016/j.seizure.2023.03.003

Zou, D. F., Li, X. Y., Lu, X. G., Wang, H. L., Song, W., Zhang, M. W., Liu, X. R., Li, B. M., Liao, J. X., Zhong, J. M., Meng, H., & Li, B. (2024). Association of FAT1 with focal epilepsy and correlation between seizure relapse and gene expression stage. *Seizure*, *116*(February 2023), 37–44. https://doi.org/10.1016/j.seizure.2023.03.003

FIGURES AND LEGENDS

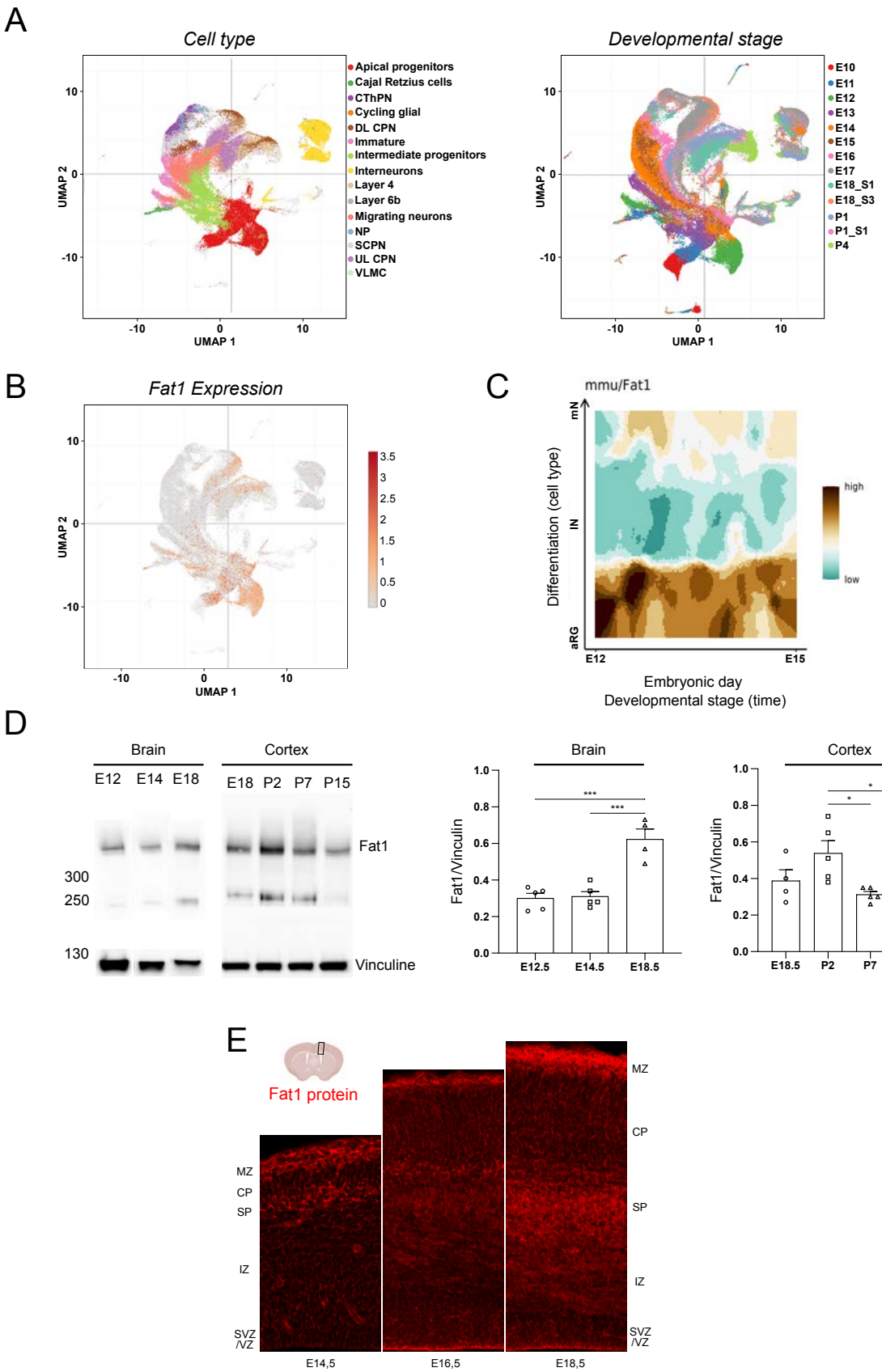


Figure 1. *Fat1* is expressed during the corticogenesis. (A) Legend of UMAP visualization from the Broad Institute scRNA-seq database showing cells across different developmental time points (E10-P4). (B) UMAP visualization shows the dynamic expression of *Fat1* across embryonic and early postnatal life in various cell types, demonstrating that *Fat1* is expressed throughout cortical development (Di Bella et al., 2021). (C) Transcriptional t-SNE clustering maps displaying *Fat1* expression from E12 to E15 and in AP, IP, or 4-day-old-neurons (Telley & al., 2019). (D) Representative Western blot (left) and quantitative data (right) assessing Fat1 protein levels in whole brain (Brain) and cortical (Cortex) samples. Data represent mean ± SEM, analyzed using One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons tests (*P < 0.05; ***P < 0.0005; for whole brain sample: E12.5 n = 5; E14.5 n = 5; E18.5 n=4; for cortex: E18.5 n=4; P2 n=5; P7 n=5; P15 n=3). (E) Representative confocal images showing *Fat1* protein expression in somatosensory cortical columns. *Fat1* is prominently expressed in the VZ/SVZ, SP, and MZ.

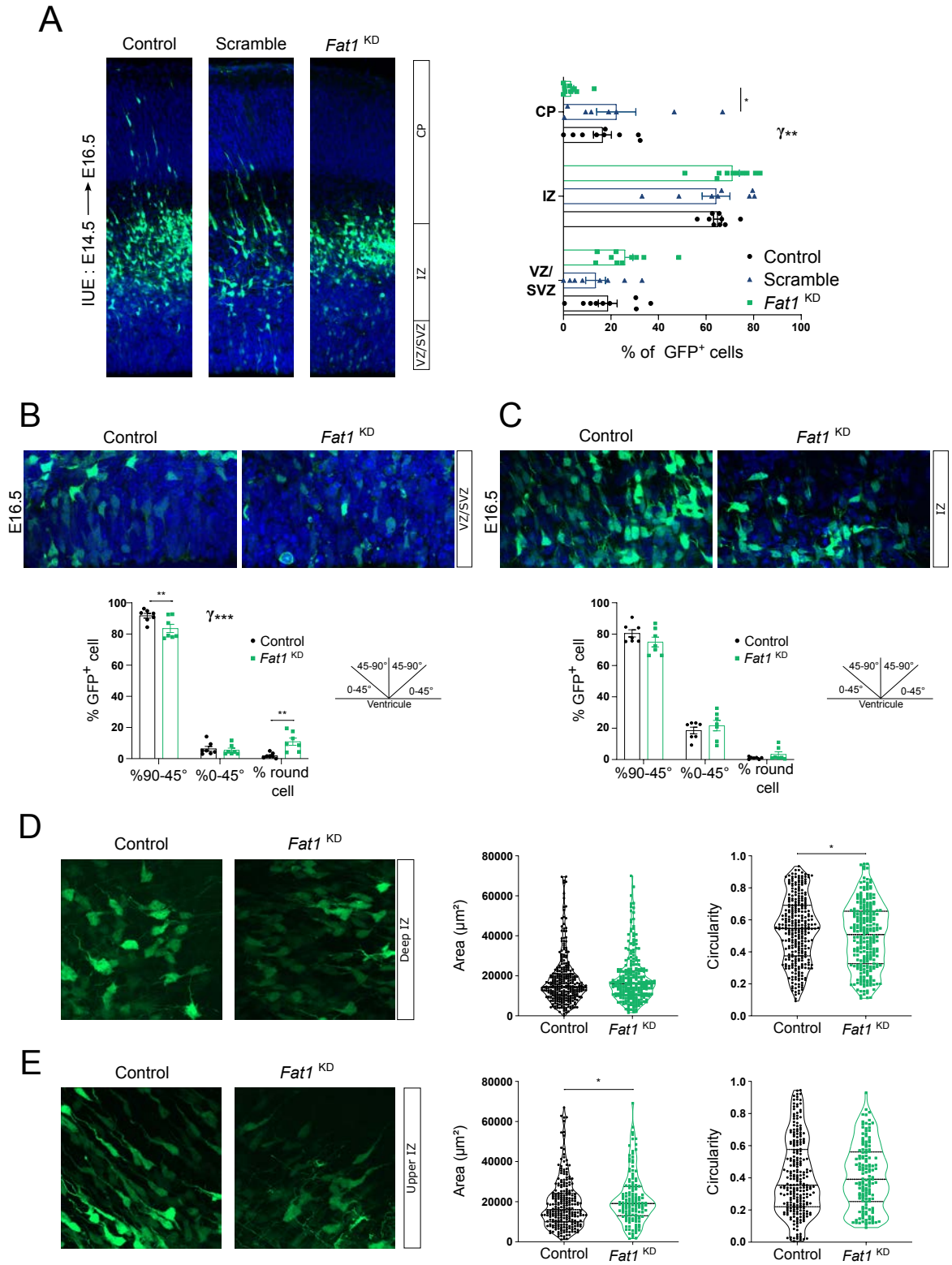

A
Control
Scramble
Fat1 KD
IUE : E14.5 → E16.5
CP
IZ
VZ/SVZ
CP
IZ
VZ/
SVZ
γ**
*
Control
Scramble
Fat1 KD
0
20
40
60
80
100
% of GFP+ cells
B
Control
Fat1 KD
E16.5
VZ/SVZ
% GFP+ cell
γ***
**
**
Control
Fat1 KD
45-90°
45-90°
0-45°
0-45°
Ventricule
%90-45°
%0-45°
% round cell
C
Control
Fat1 KD
E16.5
IZ
% GFP+ cell
Control
Fat1 KD
45-90°
45-90°
0-45°
0-45°
Ventricule
%90-45°
%0-45°
% round cell
D
Control
Fat1 KD
Deep IZ
Area (µm²)
Circularity
*
Control
Fat1 KD
E
Control
Fat1 KD
Upper IZ
Area (µm²)
*
Circularity
Control
Fat1 KD

Figure 2. *Fat1*^{KD} leads to delayed radial migration, altered orientation, and morphology of newly born neurons. (A) Fluorescence confocal micrographs of E16.5 cortex columns from control (GFP only), Scramble (Sh_*Fat1*_Scr), and *Fat1*^{KD} (sh_*Fat1*) conditions. Quantification (means ± SEM) of the percentage of localization of GFP^{+} cells in VZ/SVZ, IZ, and CP and analyzed by One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test (*P < 0.05; Control n= 9; Scramble n=8; *Fat1*^{KD} n=10). (B-C) Confocal fluorescence micrographs of E16.5 (B) VZ/SVZ and (C) IZ cortices, 2 days post-electroporation. Quantification (means ± SEM) of GFP^{+} cells orientated at 0°-45°, 45-90° or with no clear orientation (round cells) was analyzed by One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test (**P < 0.005; Control n= 7; *Fat1*^{KD} n=7). (D-E) Representative confocal fluorescence micrographs showing GFP^{+} cells in the (D) deep IZ and (E) upper IZ. Quantification of cell area and circularity was analyzed by Mann-Whitney (*P < 0.05). (D) For deep IZ analysis (Control cells=299 n=7; *Fat1*^{KD} cells= 251 n=7). (E) For upper IZ analysis (Control cells=251 n=7; *Fat1*^{KD} cells= 143 n=7).

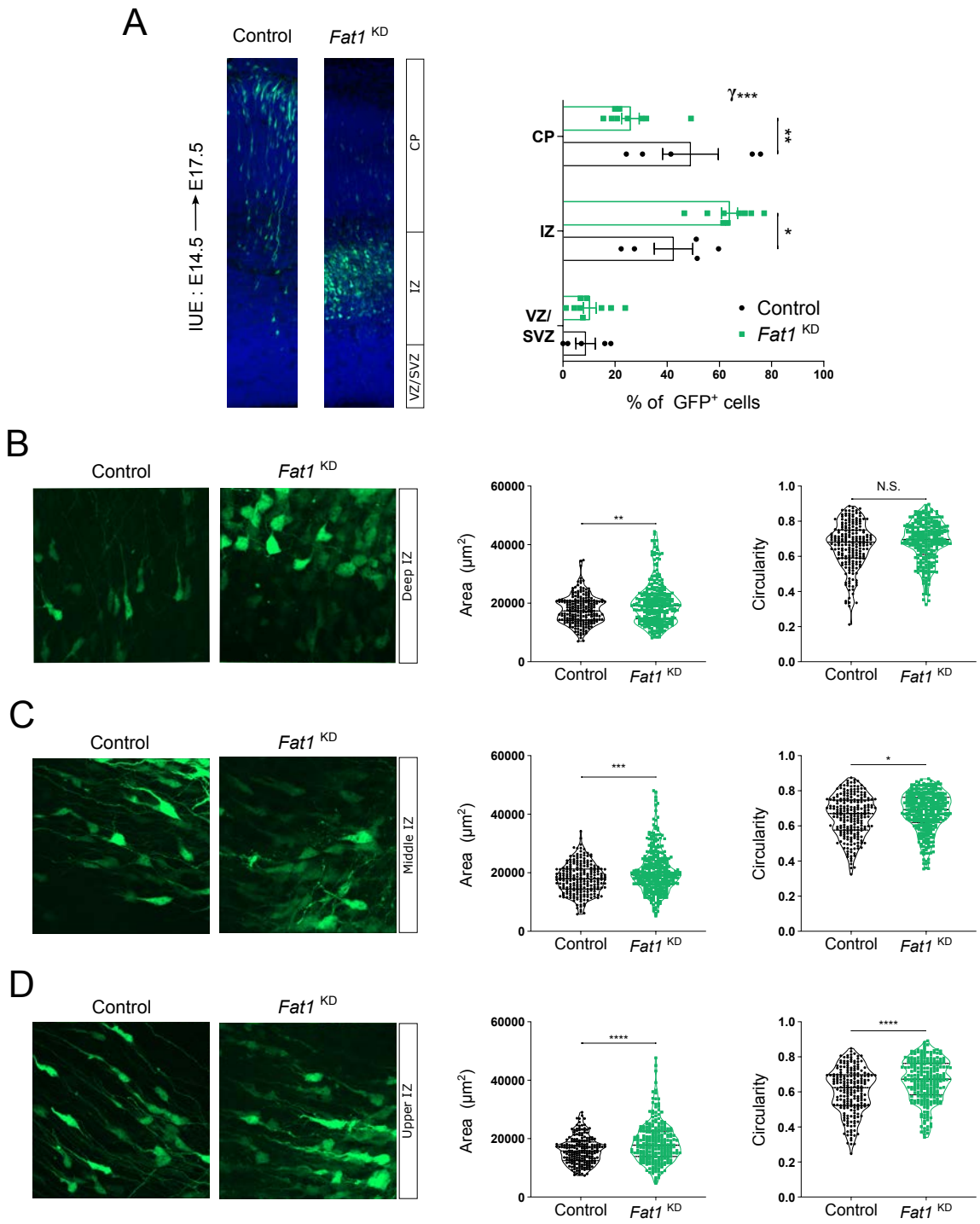

A
Control
Fat1 KD
IUE : E14.5 → E17.5
CP
IZ
VZ/SVZ
γ***
**
*
CP
IZ
VZ/
SVZ
Control
Fat1 KD
0
20
40
60
80
100
% of GFP+ cells
B
Control
Fat1 KD
Deep IZ
Area (μm2)
60000
40000
20000
0
**
Control
Fat1 KD
Circularity
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
N.S.
Control
Fat1 KD
C
Control
Fat1 KD
Middle IZ
Area (μm2)
***
Control
Fat1 KD
Circularity
*
Control
Fat1 KD
D
Control
Fat1 KD
Upper IZ
Area (μm2)
****
Control
Fat1 KD
Circularity
****
Control
Fat1 KD

Figure 3. *Fat1*^{KD} alters the morphology of newly born neurons in the IZ. (A) Fluorescence confocal micrographs of E17.5 cortex columns from control (GFP only) and *Fat1*^{KD} (sh_Fat1) conditions. Quantification (means ± SEM) of the percentage of GFP^{+} cells localized in VZ/SVZ, IZ, and CP, analyzed by One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test (*P < 0.05; **P < 0.005; Control n= 5; *Fat1*^{KD} n=9). (B-D) Representative confocal fluorescence micrographs of GFP^{+} cells in (B) deep IZ, (C) middle IZ, and (D) upper IZ. Quantification of cell area and circularity was analyzed using the Mann-Whitney test (*P < 0.05; **P < 0.005; ***P < 0.0005; ****P < 0.0001). (B) For deep IZ analysis (Control cells=214 n=7; *Fat1*^{KD} cells= 278 n=9). (C) For middle IZ analysis (Control cells=223 n= 7; *Fat1*^{KD} cells= 337 n=9). (D) For upper IZ analysis (Control cells=205 n=7; *Fat1*^{KD} cells= 250 n=9).

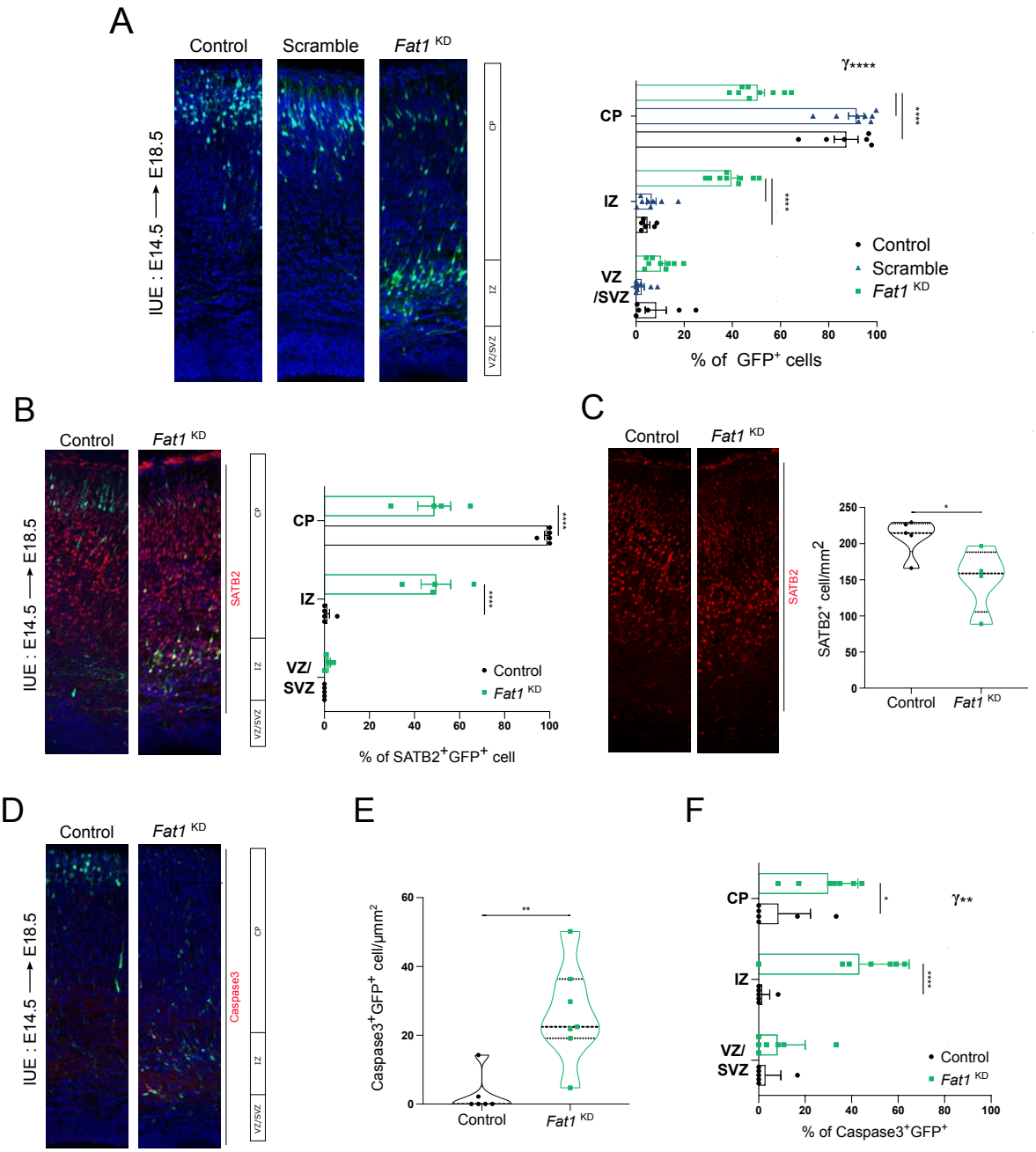
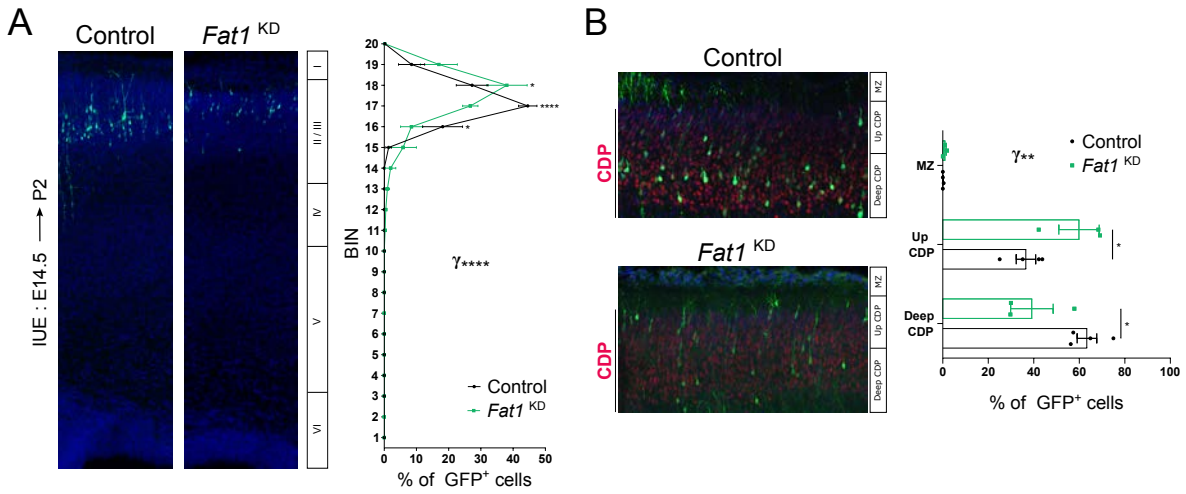

A
Control
Scramble
Fat1 KD
IUE : E14.5 → E18.5
CP
IZ
VZ/SVZ
γ****
CP
IZ
VZ /SVZ
****
****
Control
Scramble
Fat1 KD
0
20
40
60
80
100
% of GFP+ cells
B
Control
Fat1 KD
IUE : E14.5 → E18.5
SATB2
CP
IZ
VZ/SVZ
CP
IZ
VZ/ SVZ
****
****
Control
Fat1 KD
0
20
40
60
80
100
% of SATB2+GFP+ cell
C
Control
Fat1 KD
SATB2
SATB2+ cell/mm2
*
250
200
150
100
50
0
Control
Fat1 KD
D
Control
Fat1 KD
IUE : E14.5 → E18.5
Caspase3
CP
IZ
VZ/SVZ
E
Caspase3+GFP+ cell/μmm2
**
60
40
20
0
Control
Fat1 KD
F
CP
IZ
VZ/ SVZ
γ**
*
****
Control
Fat1 KD
0
20
40
60
80
100
% of Caspase3+GFP+

Figure 4. *Fat1*^{KD} cells display terminal identity but undergo apoptosis. (A) Fluorescence confocal micrographs of E18.5 cortex columns from control (GFP only), Scramble (sh_Fat1_scramble), and *Fat1*^{KD} (sh_Fat1) conditions. Quantification (means ± SEM) of the percentage of GFP^{+} cells in VZ/SVZ, IZ, and CP are analyzed by One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test (****P < 0.0001; Control n= 9; Scramble n=9; *Fat1*^{KD} n=6). (B) Fluorescence confocal micrographs of E18.5 cortex columns from control (GFP only) and *Fat1*^{KD} (sh_Fat1) stained with the Satb2 marker. Quantification (means ± SEM) of the percentage of Satb2^{+}/GFP^{+} cells localized in VZ/SVZ, IZ, and CP are analyzed by One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test (****P < 0.0001; Control n= 5; *Fat1*^{KD} n=4). (C) Fluorescence confocal micrographs of E18.5 cortical columns of control (GFP only) and *Fat1*^{KD} (sh_Fat1) stained with Satb2 marker. Quantification (means ± SEM) of Satb2^{+} cell density per mm^2, analyzed by two-tailed Student's t-test (*P < 0.05; Control n=5; *Fat1*^{KD} n=4). (D) Fluorescence confocal micrographs of E18.5 cortical columns from control (GFP only) and *Fat1*^{KD} (sh_Fat1) stained with the Caspase3 marker. (E) Quantification (means ± SEM) of Caspase3^{+}/GFP^{+} cells density per mm^2, analyzed by Mann-Witney test (**P < 0.005; Control n=6; *Fat1*^{KD} n=7). (F) Quantification (means ± SEM) of the percentage of Caspase3^{+}/GFP cells localized in VZ/SVZ, IZ, and CP are analyzed by One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test (*P < 0.05; **P < 0.005; ****P < 0.0001; Control n= 6; *Fat1*^{KD} n=7).



878
879

880 **Figure 5.** *Fat1*^{KD} neurons over-migrate at post-natal stages (A) Fluorescence confocal
881 micrographs of P2 cortical columns from control (GFP only) and *Fat1*^{KD} (sh_Fat1) conditions.
882 Quantification (means ± SEM) of the percentage of GFP^{+} cells localized in each BIN, analyzed
883 by One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test (*P < 0.05; ****P <
884 0.0001; Control n= 5; *Fat1*^{KD} n=5). (B) Fluorescence confocal micrographs of P2 layer II-III
885 cortical sections from control (GFP only) and *Fat1*^{KD} (sh_Fat1) stained with CDP marker.
886 Quantification (means ± SEM) of the percentage of GFP^{+} cell localization in deep CDP, upper
887 CDP, and MZ, analyzed by One-way ANOVA and a Bonferroni's multiple comparisons test
888 (*P < 0.05; **P < 0.005; Control n= 4; *Fat1*^{KD} n=3).

889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903

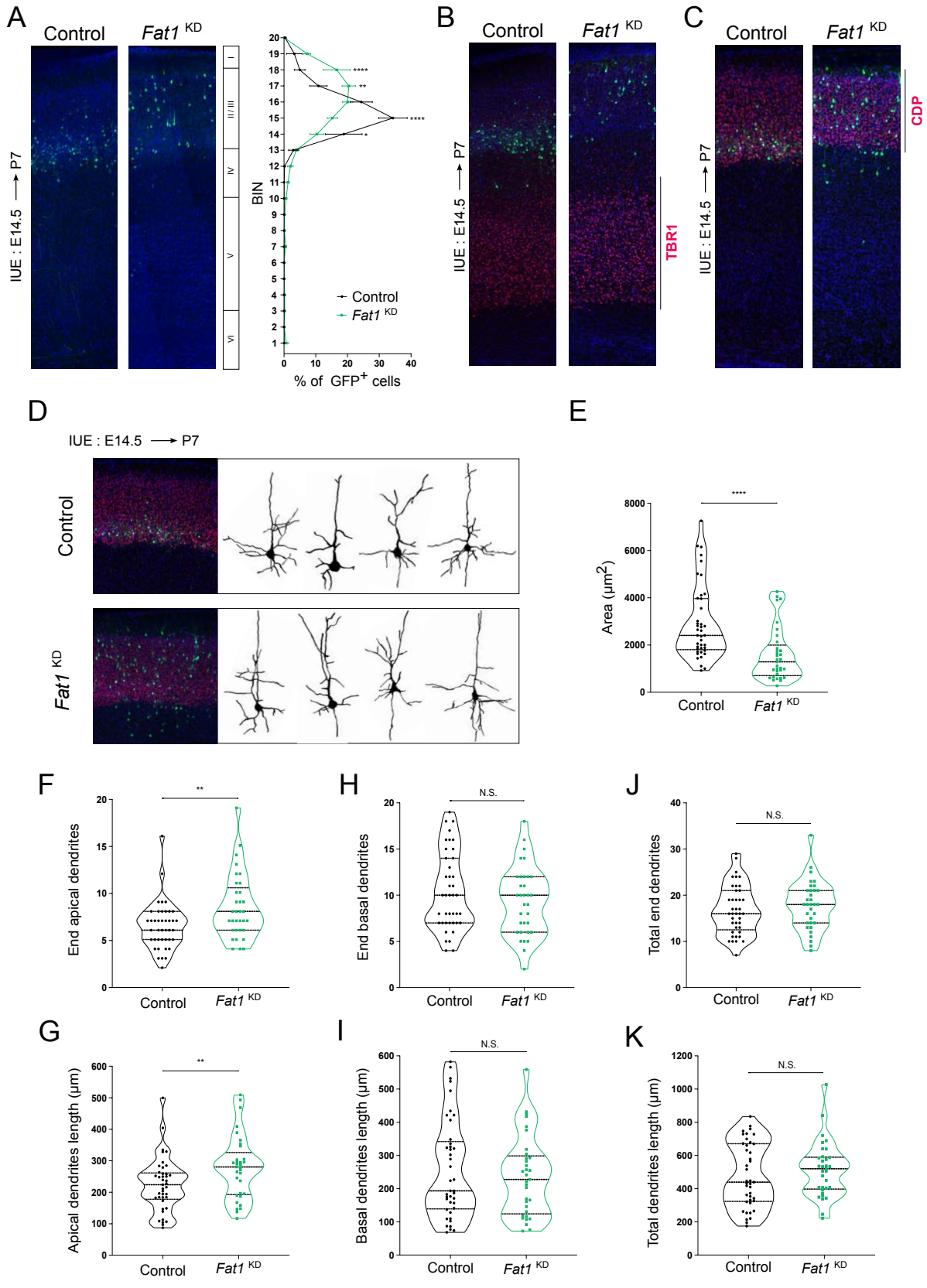
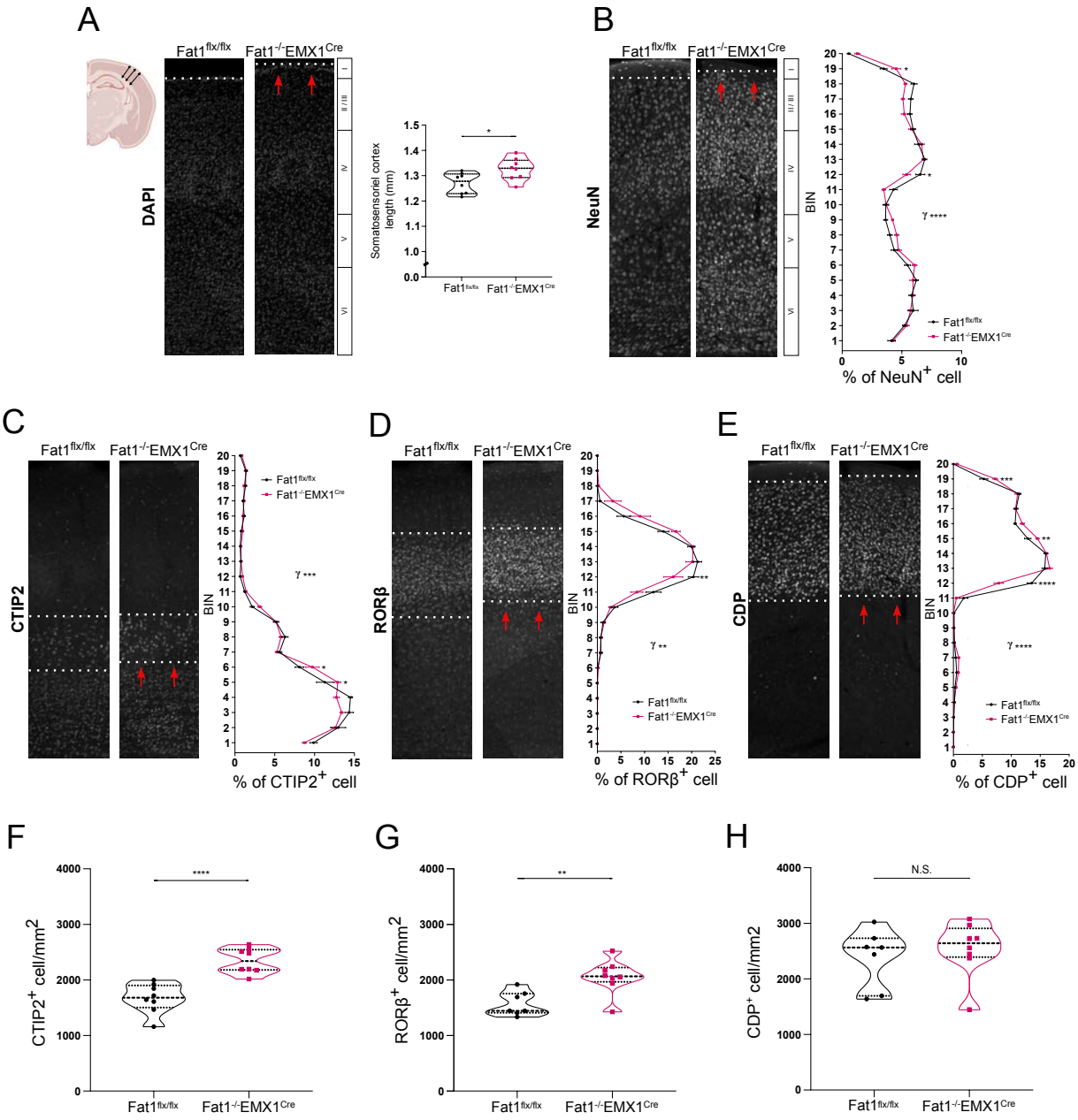

A
Control
Fat1 KD
IUE : E14.5 → P7
I
II / III
IV
V
VI
BIN
% of GFP+ cells
Control
Fat1 KD
B
Control
Fat1 KD
IUE : E14.5 → P7
TBR1
C
Control
Fat1 KD
IUE : E14.5 → P7
CDP
D
IUE : E14.5 → P7
Control
Fat1 KD
E
Area (µm2)
Control
Fat1 KD
F
End apical dendrites
Control
Fat1 KD
H
End basal dendrites
N.S.
Control
Fat1 KD
J
Total end dendrites
N.S.
Control
Fat1 KD
G
Apical dendrites length (µm)
Control
Fat1 KD
I
Basal dendrites length (µm)
N.S.
Control
Fat1 KD
K
Total dendrites length (µm)
N.S.
Control
Fat1 KD

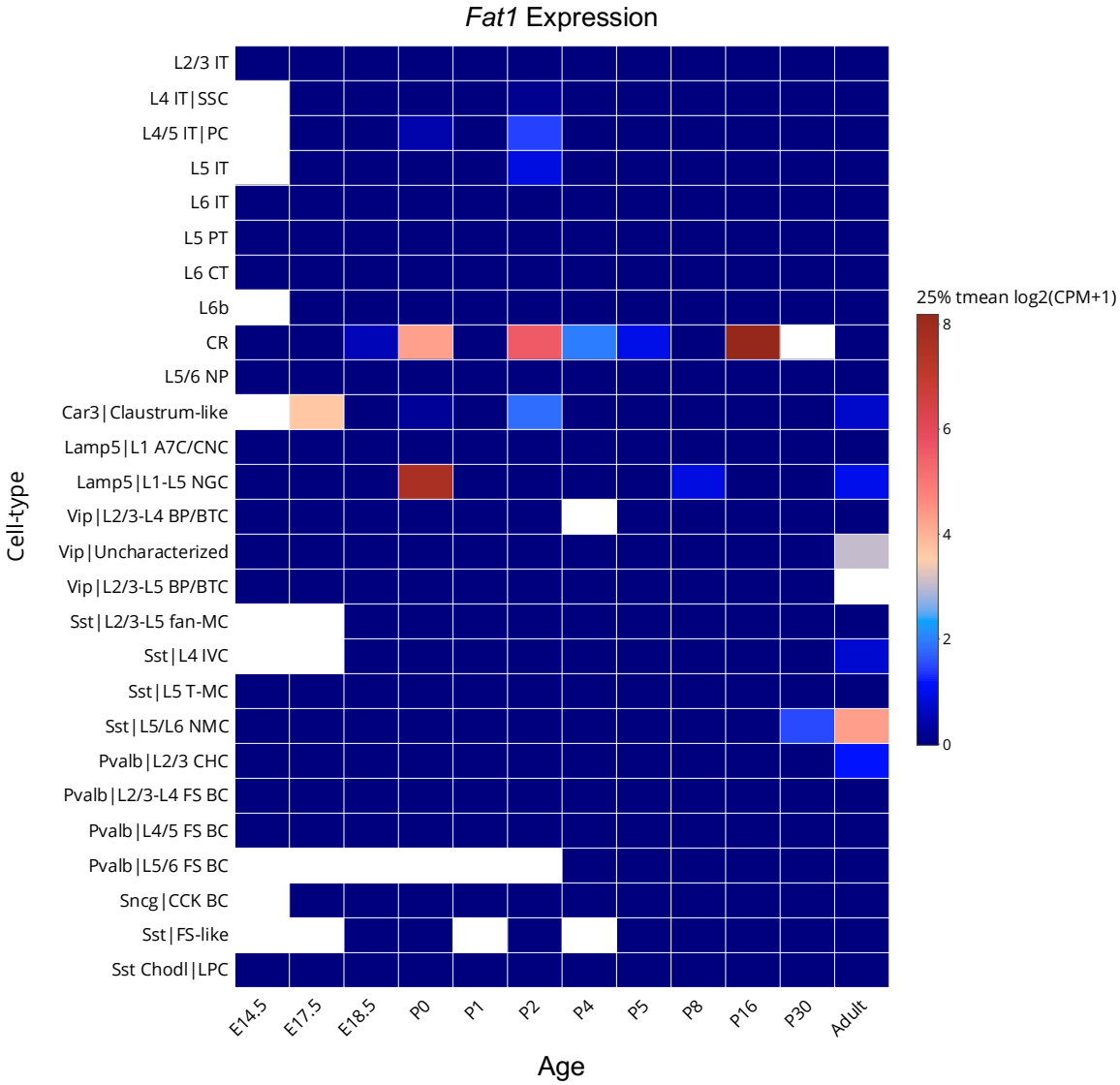
Figure 6. *Fat1*^{KD} neurons over-migrate and exhibit altered morphological features. (A) Fluorescence confocal micrographs of P7 cortical columns from control (GFP only) and *Fat1*^{KD} (sh_Fat1) mice. Quantification (means ± SEM) of the percentage of GFP^{+} cells localized in each BIN, analyzed by One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test (*P < 0.05; **P < 0.005; ***P < 0.0005; ****P < 0.0001; Control n= 6; *Fat1*^{KD} n=6). (B) Fluorescence confocal micrographs of P7 cortical columns stained with Tbr2 (deep layer marker) from control (GFP only) and *Fat1*^{KD} (sh_Fat1) conditions. (C) Fluorescence confocal micrographs of P7 cortical columns stained with CDP (upper layer marker) from control (GFP only) and *Fat1*^{KD} (sh_Fat1). (D) Fluorescence confocal micrographs of P7 layer II-III cortical sections stained with CDP marker from control (GFP only) and *Fat1*^{KD} (sh_Fat1) conditions, alongside illustration of neuron reconstruction. (E) Quantification (means ± SEM) of neuron area. (F-H-J) Quantification of the number of (F) apical dendrites, (H) basal dendrites, and (J) total dendrites between control and *Fat1*^{KD} condition. (G-I-K) Quantification of the length of (G) apical dendrites, (I) basal dendrites, and (K) total dendrites between control and *Fat1*^{KD} condition. (E-K) Quantification (means ± SEM) of the two groups is tested by Mann-Whitney (**P < 0.005; ****P < 0.0001; Control cells=41 n= 10; *Fat1*^{KD} cells=33 n=9).



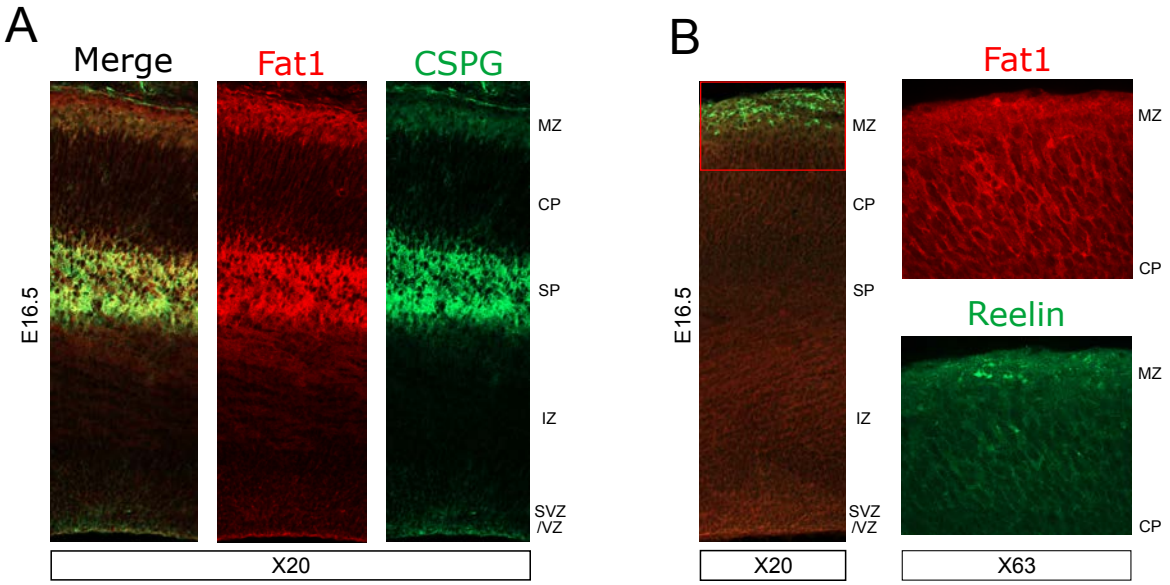
924
925

926 **Figure 7.** *Fat1*$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} display altered cortical lamination. (A) Fluorescence confocal
927 micrographs of P15 cortical columns of control *Fat1*$^{flx/flx}$ and *Fat1*$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} mice.
928 Quantification (means ± SEM) of somatosensory cortex length, analyzed by two-tail Student's
929 t-test (*P < 0.05; *Fat1*$^{flx/flx}$ n= 8; *Fat1*$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} n= 8). (B-E) Fluorescence confocal
930 micrographs of P15 cortical columns from control *Fat1*$^{flx/flx}$ and *Fat1*$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} stained
931 with (B) NeuN, (C) Ctip2, (D) RoRβ and (E) CDP markers. Quantification (means ± SEM) of
932 the percentage of GFP^{+} cells localization in each BIN, analyzed by One-way ANOVA followed
933 by Bonferroni's multiple comparisons test (*P < 0.05; **P < 0.005; ***P < 0.0005; ****P <
934 0.0001; *Fat1*$^{flx/flx}$ n= 7/8; *Fat1*$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} n=8). (F-H) Quantification (means ± SEM) of
935 cell density for (F) CTIP2^{+}, (G) RoRβ^{+} (H) CDP^{+} cell per mm^{2}, analyzed by two-tail Student's
936 t-test (**P < 0.005; ****P < 0.0001; *Fat1*$^{flx/flx}$ n= 7/8; *Fat1*$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} n=8).

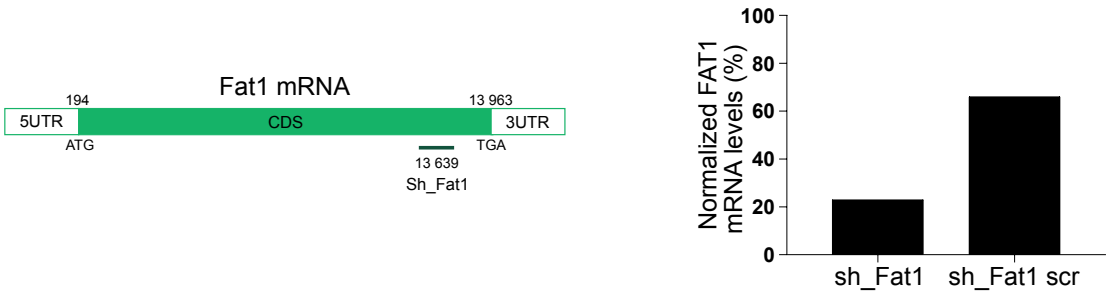
SUPPLEMENTARY FIGURES AND LEGENDS



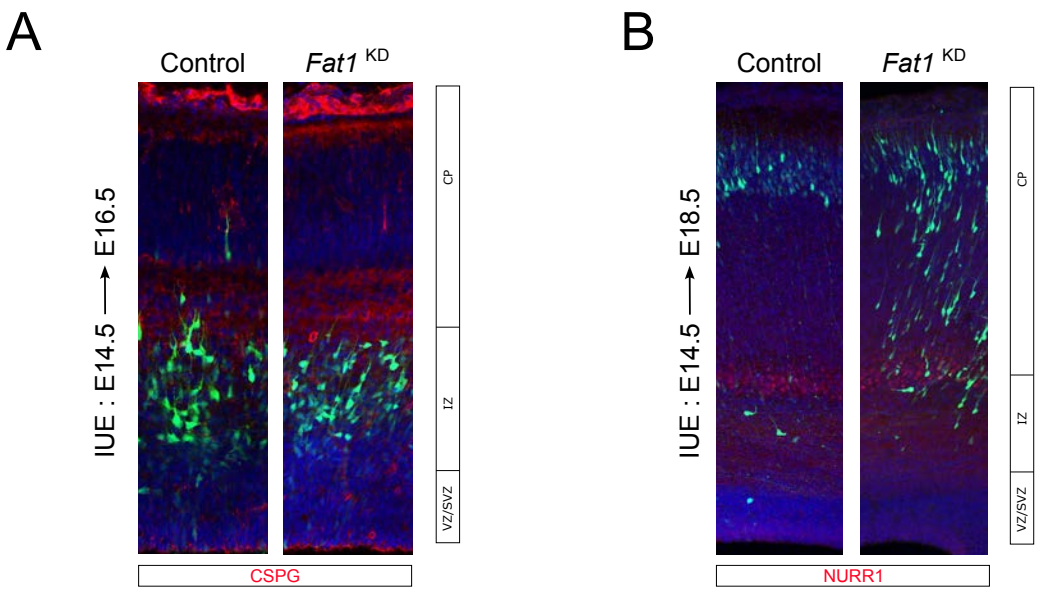
Supplementary 1. *Fat1* expression during cortical development. Heatmap showing *Fat1* expression in a panel of neuronal cell types (x-axis) at embryonic and postanal stages of cortical development (y-axis) (Mathieu et al., 2024).



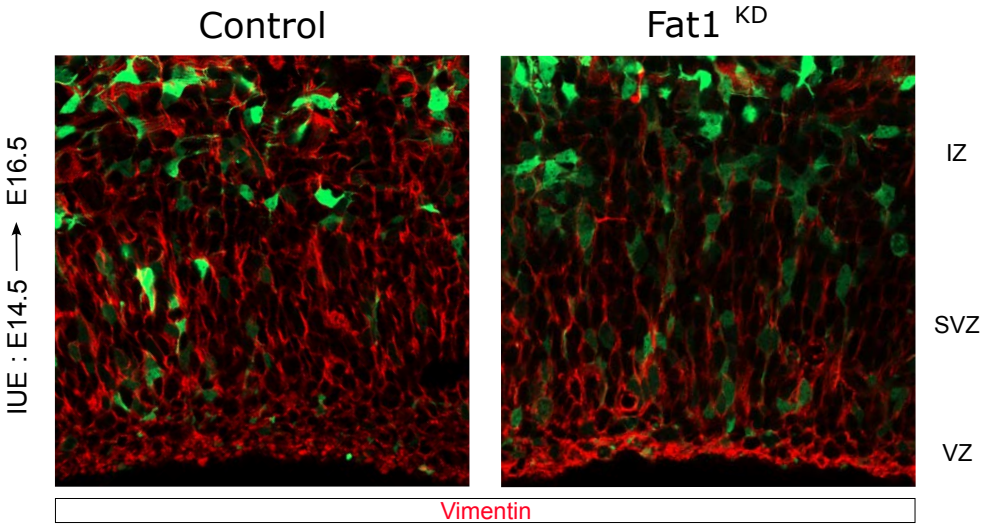
Supplementary 2. *Fat1* is co-expressed with the subplate and the Cajal-Retzius cells. (A) Confocal micrographs of somatosensory cortical columns at E16.5 immunostained with *Fat1* and CSPG, showing their overlapping expression domain in the SP region. (B) Confocal micrographs of somatosensory cortical columns at E16.5 immunostained with *Fat1* and Reelin, showing co-expression in the MZ.



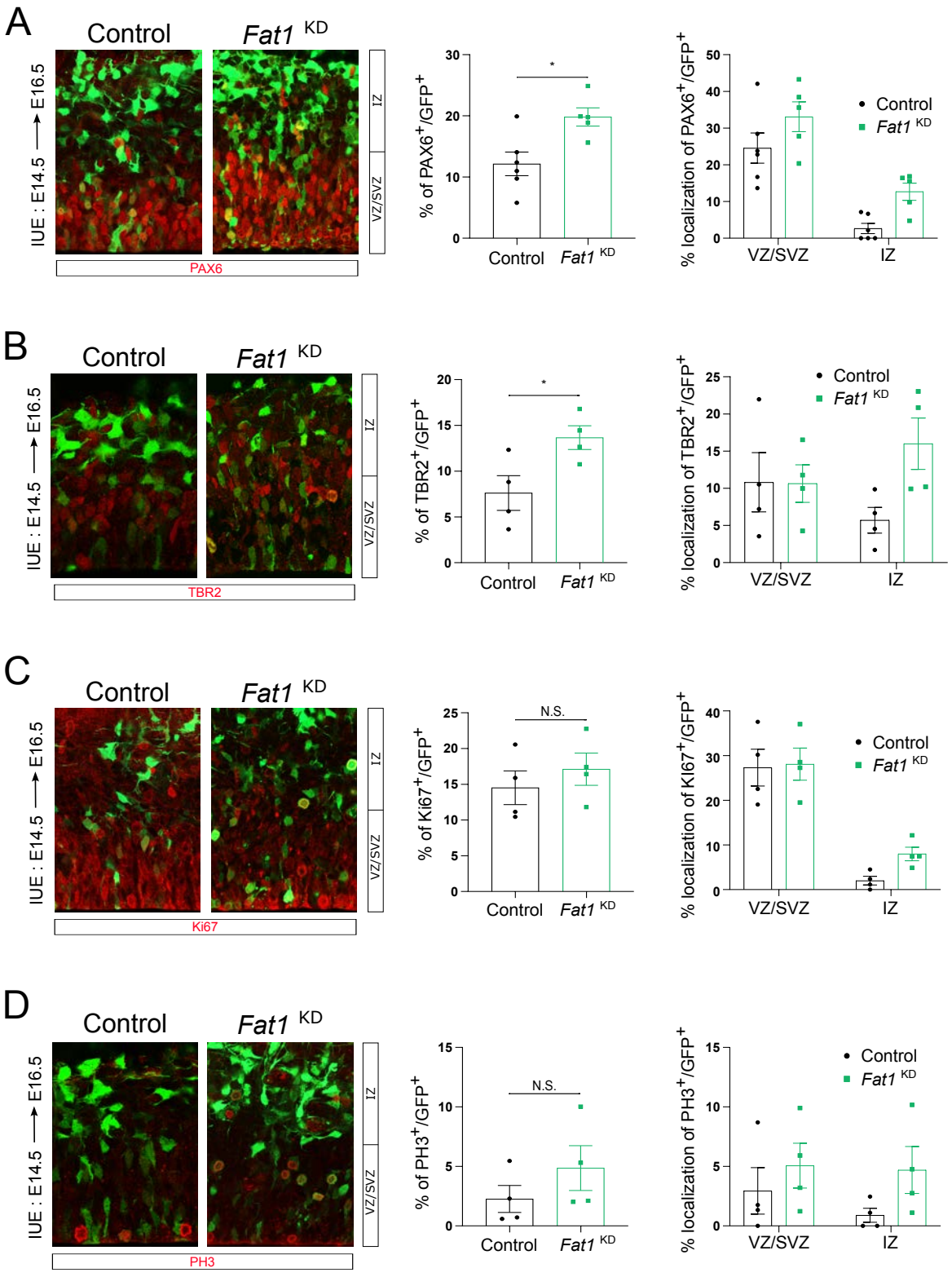
Supplementary 3. Validation of *Fat1* sh_RNA. (A) Schematic diagram showing the sh_RNA target site within the coding sequence of *Fat1* mRNA. (B) Knockdown of endogenous *Fat1* mRNA expression in mouse N2A cells, measured by qPCR 48 hours after transfection with sh_RNA_*Fat1* or sh_RNA_Scramble. Cyclophilin A was used for normalization.



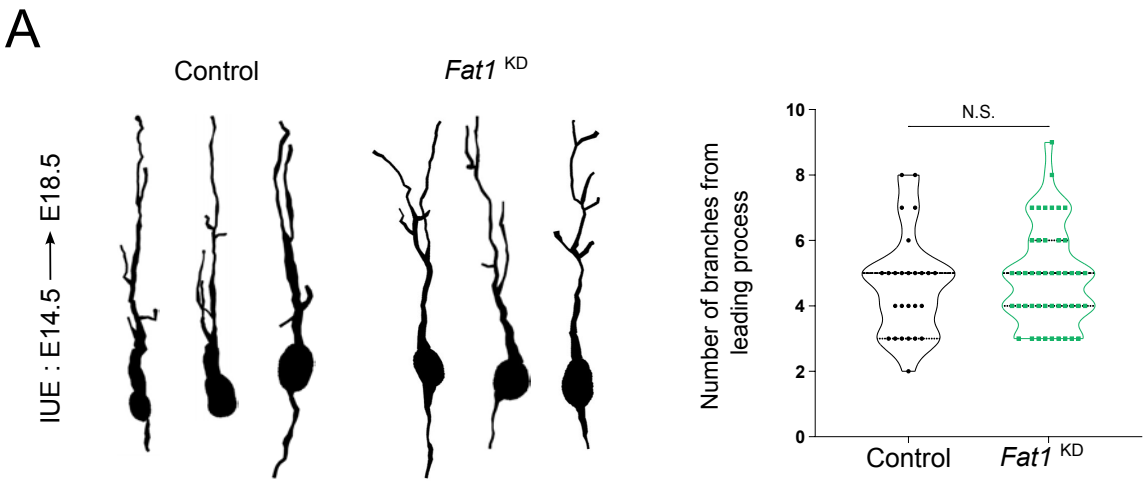
Supplementary 4. *Fat1*^{KD} newly born neurons are blocked beneath the subplate. (A) Fluorescence confocal micrographs of E16.5 cortex columns from control (GFP only) and *Fat1*^{KD} (sh_Fat1) conditions, immunostained with CSPG to visualize the SP. (B) Fluorescence confocal micrographs of E18.5 cortex columns from control (GFP only) and *Fat1*^{KD} (sh_Fat1) conditions, immunostained with Nurr1 to visualize the nSP.



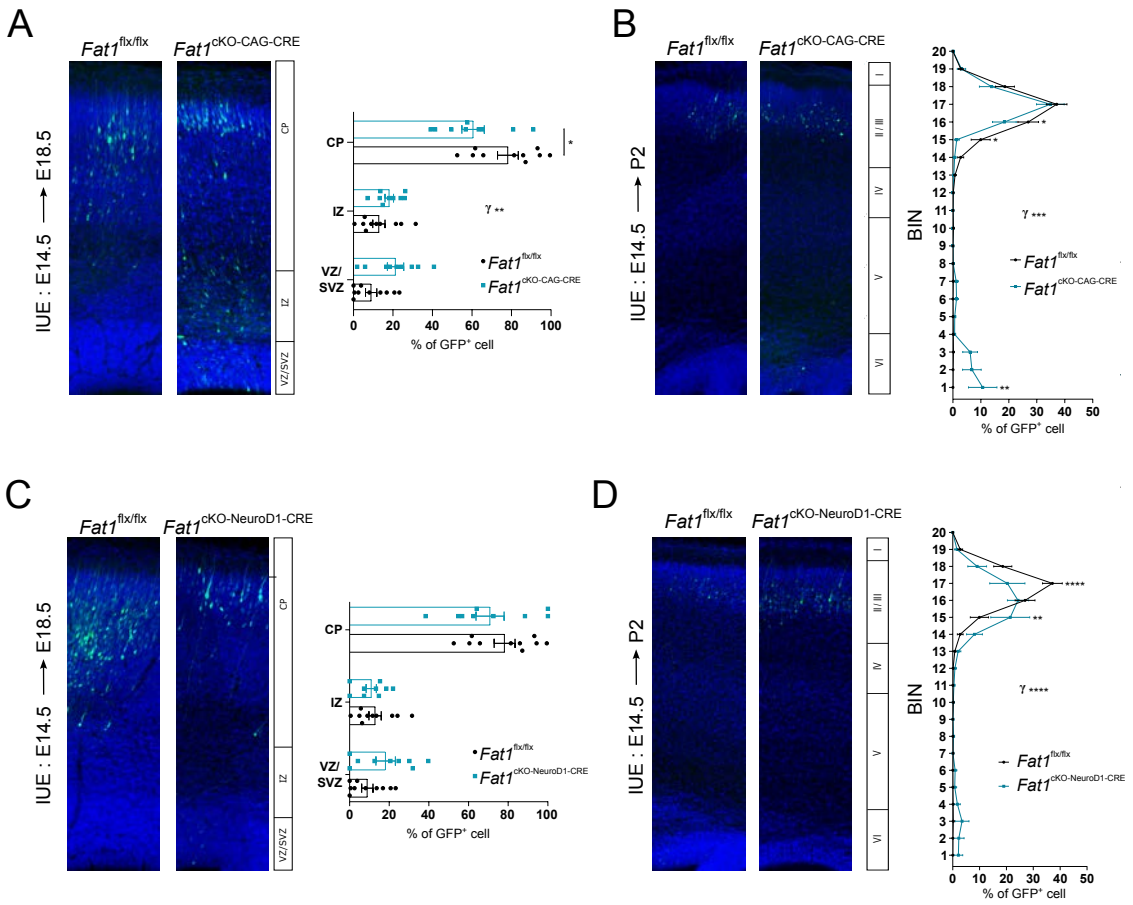
Supplementary 5. *Fat1*^{KD} does not affect radial glia fiber integrity. (A) Confocal fluorescence micrographs of the VZ/SVZ/IZ regions from coronal sections of E16.5 mouse brain electroporated at E14.5 with GFP alone (left) or combined with sh_Fat1 (right), immunostaining with vimentin to visualize radial glia fibers.


A
Control
Fat1 KD
IUE : E14.5 → E16.5
VZ/SVZ
IZ
PAX6
% of PAX6+/GFP+
Control
Fat1 KD
% localization of PAX6+/GFP+
VZ/SVZ
IZ
B
TBR2
% of TBR2+/GFP+
% localization of TBR2+/GFP+
C
Ki67
% of Ki67+/GFP+
% localization of KI67+/GFP+
N.S.
D
PH3
% of PH3+/GFP+
% localization of PH3+/GFP+

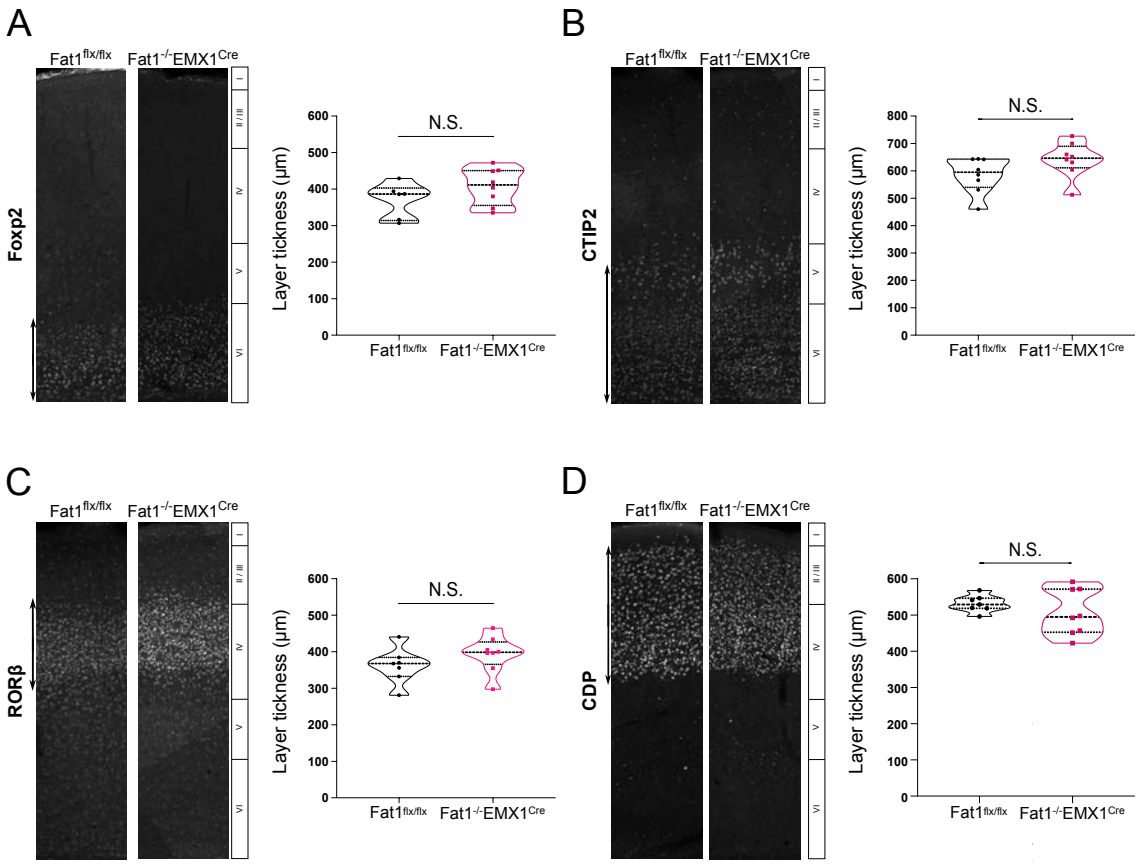
Supplementary 6. *Fat1*^{KD} increases the neural progenitor pool without affecting cell cycle progression and their localization. (A-D) Confocal fluorescence micrographs of VZ/SVZ/IZ regions from coronal sections of E16.5 mouse brain electroporated at E14.5 with GFP alone (left) or combined with sh_ *Fat1* (right) immunostained with (A) Pax6, (B) Tbr2, (C) Ki67 and (D) PH3. Quantification of the ratio of co-stained GFP^{+} cells per section, data are mean ±SEM and analyzed by two-tailed Welch's t-test (*P < 0.05; control n= 6/4; *Fat1*^{KD} n= 5/4). Quantification of the localization of co-stained GFP^{+} in the VZ/SVZ and IZ area, data are mean ± SEM and analyzed One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test (control n= 6/4; *Fat1*^{KD} n= 5/4).



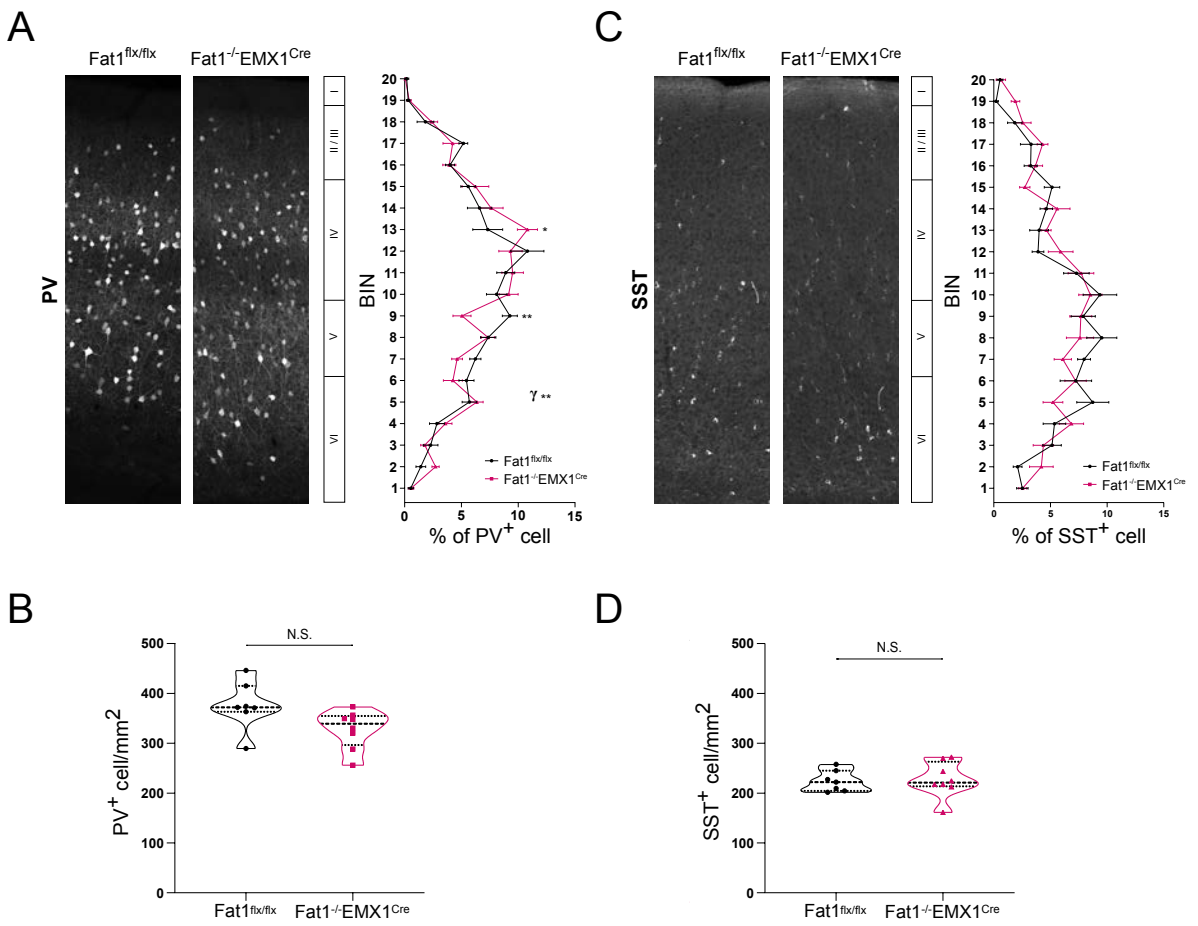
Supplementary 7. *Fat1*^{KD} does not affect the number of leading processes in bipolar neurons. (A) Illustrations of reconstructed bipolar neurons from coronal sections of E18.5 mouse brains electroporated at E14.5 with GFP alone (left) or combined with sh_*Fat1* (right). Quantification of the number of leading processes is presented as means ±SEM and analyzed by the Mann-Whitney test (Control cells=26 n=6; *Fat1*^{KD} cells=46 n=10).



Supplementary 8. *Fat1*$^{cKO\text{-}CAG\text{-}CRE}$ and *Fat1*$^{cKO\text{-}NeuroD1\text{-}CRE}$ neurons show altered final positioning at post-natal stages. (A-C) Fluorescence confocal micrographs of E18.5 cortical columns from control *Fat1*$^{flx/flx}$ (GFP only) and (A) *Fat1*$^{cKO\text{-}CAG\text{-}CRE}$ (p.CAG-CALNL and p.CAG-CRE) or (C) *Fat1*$^{cKO\text{-}NeuroD1\text{-}CRE}$ (p.CAG-CALNL and p.NEUROD1-CRE). Quantification (means ± SEM) of the percentage of GFP^{+} cells localization in VZ/SVZ, IZ, and CP, analyzed by One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test (*P < 0.05; **P < 0.005; *Fat1*$^{flx/flx}$ n= 10; *Fat1*$^{cKO\text{-}CAG\text{-}CRE}$ n=9; *Fat1*$^{cKO\text{-}NeuroD1\text{-}CRE}$ n=9). (B) Fluorescence confocal micrographs of P2 cortical columns from control *Fat1*$^{flx/flx}$ (GFP only) and (A) *Fat1*$^{cKO\text{-}CAG\text{-}CRE}$ (p.CAG-CALNL and p.CAG-CRE) or (C) *Fat1*$^{cKO\text{-}NeuroD1\text{-}CRE}$ (p.CAG-CALNL and p.NEUROD1-CRE). Quantification (means ± SEM) of the percentage of GFP^{+} cells localization in VZ/SVZ, IZ, and CP, analyzed by One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test (*P < 0.05; **P < 0.005; *Fat1*$^{flx/flx}$ n= 7; *Fat1*$^{cKO\text{-}CAG\text{-}CRE}$ n=5; *Fat1*$^{cKO\text{-}NeuroD1\text{-}CRE}$ n=7).



Supplementary 9. *Fat1*$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} mice show no significant difference in cortical layer length. (A-D) Fluorescence confocal micrographs of P15 cortical columns from control *Fat1*$^{flx/flx}$ and *Fat1*$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} stained with (A) Foxp2, (B) Ctip2, (C) RoRβ, and (D) CDP markers. Quantification (means ± SEM) of the length of each cortical layer marker was analyzed data are mean ±SEM and analyzed by two-tailed Welch's t-test. (A) For the Foxp2 analyses (*Fat1*$^{flx/flx}$ n= 6; *Fat1*$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} n=8). (B) For the Ctip2 analyses (*Fat1*$^{flx/flx}$ n= 8; *Fat1*$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} n=8). (C) For the RoRβ analyses (*Fat1*$^{flx/flx}$ n= 7; *Fat1*$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} n=8). (D) For the CDP analyses (*Fat1*$^{flx/flx}$ n= 7; *Fat1*$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} n=8).



Supplementary 10. *Fat1*$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} mice show no significant alterations in interneuron lamination and density. (A-C) Fluorescence confocal micrographs of P15 cortical columns from control *Fat1*$^{flx/flx}$ and *Fat1*$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} stained with (A) PV and (C) SST interneurons markers. Quantification (means ± SEM) of the percentage of GFP^{+} cells localization in each BIN was analyzed by One-way ANOVA and a Bonferroni's multiple comparisons test (*P < 0.05; **P < 0.005; *Fat1*$^{flx/flx}$ n= 7; *Fat1*$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} n=8). (B-D) Quantification (means ± SEM) of (B) PV^{+} and (D) SST^{+} cell density per mm^{2}, analyzed by two-tail Student t-test (*Fat1*$^{flx/flx}$ n= 7; *Fat1*$^{flx/flx}$-EMX1^{CRE} n=8).

Partie II-4 – Est-ce que Fat1 régule la migration neuronale par la modulation de la voie HIPPO/Mst ?

Notre étude a révélé les rôles multiples de Fat1 dans le développement cortical et notamment dans la migration radiale. Cependant, les processus moléculaires et cellulaire qui participe à la modulation de la migration ne sont pas établis. Dans la littérature, il a été décrit que *Fat1* participe à l'activation de la voie Hippo/Mst à l'aide de son domaine intracellulaire (Ahmed et al., 2015 ; Martin et al., 2018 ; Peng et al., 2021), agissant ainsi sur le complexe Yap/Taz. De plus, Cappello et al. (2013) ont déjà souligné l'implication de *Yap* dans le processus de migration neuronale avec *Fat4*. Dans cette étude, ils réussissent à restaurer la migration radiale en co-injectant un shRNA dirigée contre Fat4 et un micro-ARN ciblant Yap. Nous avons donc décidé d'explorer si la voie de signalisation Hippo/Mst, et en particulier ses effecteurs Yap et Taz, participe à la régulation du processus de migration radiale avec Fat1. Pour explorer ceci nous avons générée des modèles de souris knockdown avec des ARN interférents dirigée contre la séquence codante de Taz (sh_TAZ : 5'- CCTGCATTTCTGTGGCAGAT-3', *mismatch* : 5'-ACTTCATTTATGTGGCAGATA-3') et Yap (5'- TGAGAACAATGACAACCAATA -3', *mismatch* : et 5'-TAATAACAATTACAACCAATA-3') à l'aide de la technique d'électroporation in utero. Nous avons validé leur efficacité par Western Blot (Figure 50. A). Nos résultats indiquent que les sh_Yap et sh_TAZ diminue d'environ 40% l'expression de *Yap* (Figure 5O. B) et de *Taz* (Figure 50. C), respectivement.

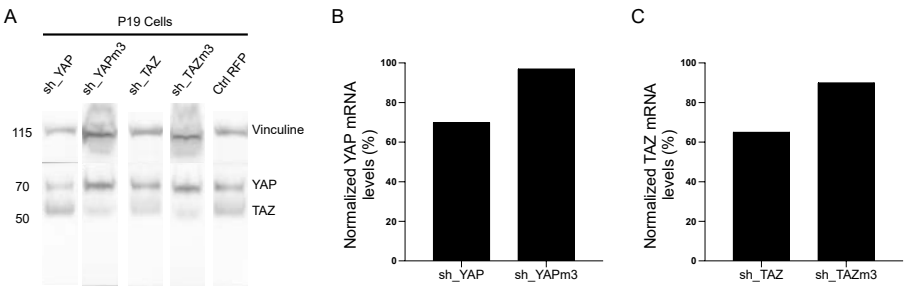


Figure 50. Validation des shRNA de Yap et Taz. (A) Western Blot du niveau d'expression de Yap et de Taz après transfections des sh_YAP, sh_YAPm3 (mismatch), sh_TAZ, sh_TAZm3 (mismatch) et RFP (ctrl RFP) dans des cellules P19 de souris. (B) Quantification de la réduction de l'ARNm endogène de YAP dans les cellules P19 de souris transfectées avec le sh_YAP et sh_YAPm3. La vinculine a été utilisée pour la normalisation. (C) Quantification de la réduction de l'ARNm endogène de TAZ dans les cellules P19 de souris transfectées avec le sh_TAZ et sh_TAZm3. La vinculine a été utilisée pour la normalisation.

Dans un premier temps, nous avons injecté par IUE les sh_Yap (*Yap* ^{KD}) et sh_Yapm3 ainsi que sh_Taz (*Taz* ^{KD}) et sh_Tazm3 (Figure 51) chez des souris sauvages. Nous avons réalisé nos EIU au stades E14.5 et avons récupéré les cerveaux à E18.5. Nos résultats montrent que les cellules *Taz*^{KD} ne parviennent pas à migrer dans la CP et restent bloquées dans la IZ contrairement aux conditions contrôle et mismatch (Figure 51. A). Les cellules *Yap*^{KD} présentent le même phénotype avec un arrêt de migration et des cellules bloquées dans la IZ (Figure 51. B). Ainsi, les conditions *Taz*^{KD} et *Yap*^{KD} induisent un retard de la migration radiaire.

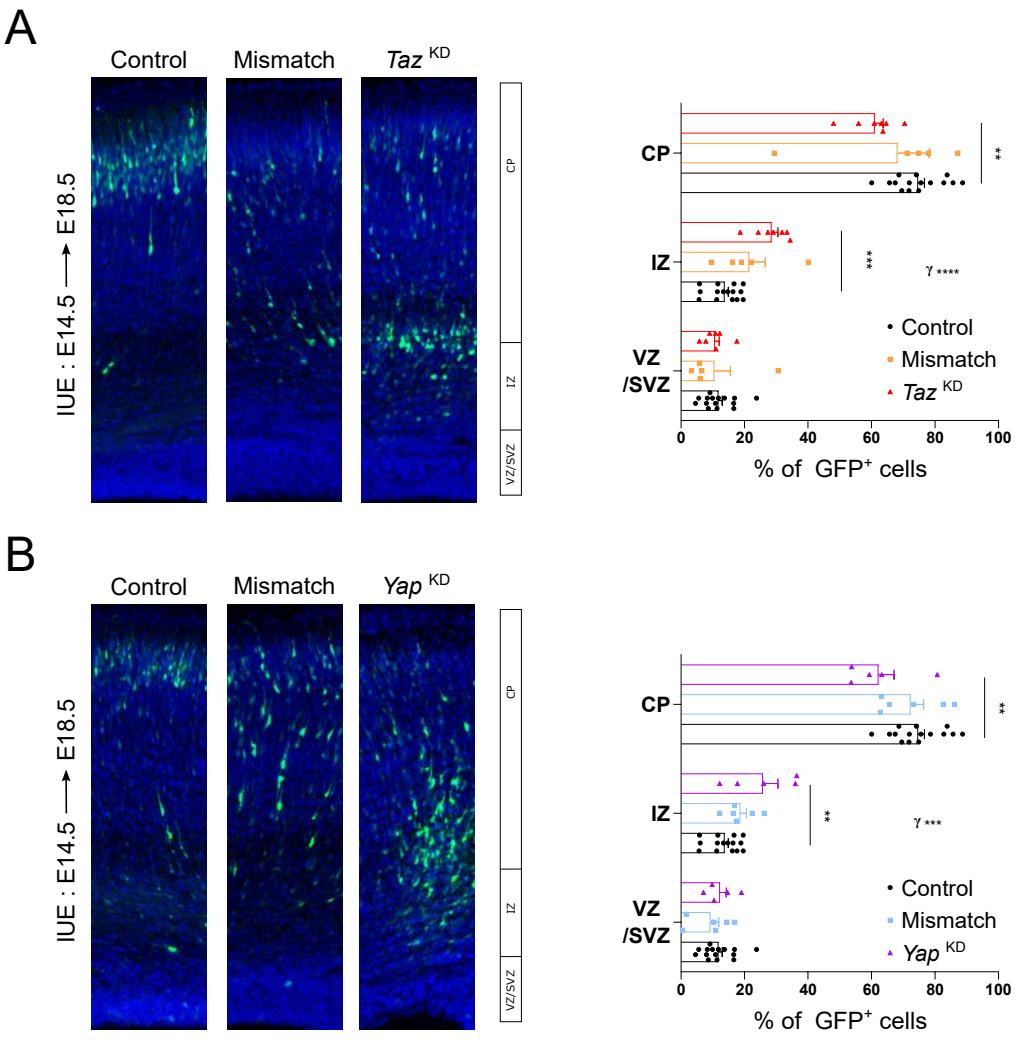


Figure 51. Mise au point des shRNA de Yap et Taz par IUE. (A-B) Illustration confocale de colonnes corticales à E18.5 représentative des conditions contrôles (p.CAG-GFP), (A) mismatch (p.CAG-GFP + Sh_TAZm3) et *Taz*^{KD} (p.CAG-GFP + sh_TAZ) et (B) mismatch (p.CAG-GFP + Sh_YAPm3) et *Yap*^{KD} (p.CAG-GFP + sh_YAP). Quantification (moyennes ± SEM) du pourcentage de localisation des cellules GFP+ dans la VZ/SVZ, IZ et la CP, analysée par one-way ANOVA suivie du test de comparaisons multiples de Bonferroni (*P < 0,05 ; **P < 0,005 ; ***P < 0,0005 ; ****P < 0,0001) (A) Pour l'étude de Taz (contrôle n=15 ; Mismatch n=5 ; *Taz*^{KD} n=7). (B) Pour l'étude de Yap (contrôle n=15 ; Mismatch n=6 ; *Taz*^{KD} n=5).

Par la suite, nous avons co-injecté le sh_Fat1 avec le sh_Taz ou le sh_Yap afin d'analyser la migration radiale lors de leur inactivation combinée. Nos résultats montrent que les cellules *Taz + Fat1*^{KD} restent bloquées au sein de la IZ et ne parviennent pas à atteindre la CP par rapport à la condition contrôle (Figure 52. A). En revanche, le phénotype du défaut de migration n'est pas exacerbé par rapport à la condition *Fat1*^{KD} (Figure 52. A). Les cellules *Yap + Fat1*^{KD} présentent elles aussi un retard de migration similaire et reste bloquée dans la IZ (Figure 52. B). Cependant, le phénotype de migration est exacerbé par rapport au cellules déplétée avec *Fat1*^{KD} uniquement (Figure 52. B).

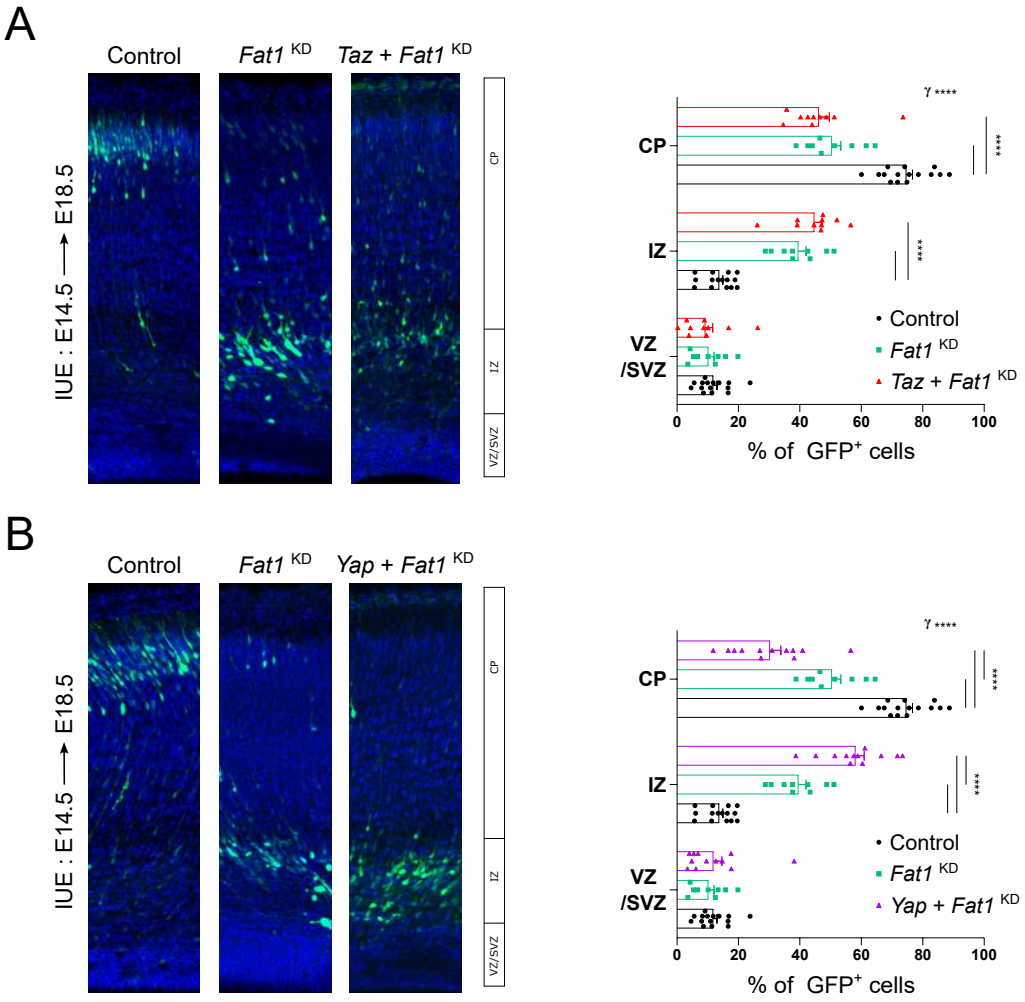


Figure 52. La délétion de Yap ou Taz combinée à celle de Fat1 ne restaure pas la migration radiaire à E18.5. (A-B) Illustration confocale de colonnes corticales à E18.5 représentative des conditions contrôles (p.CAG-GFP), *Fat1*^{KD} (p.CAG-GFP + Sh_FAT1), (A) *Taz+Fat1*^{KD} (p.CAG-GFP + Sh_FAT1+ sh_TAZ) et (B) *Yap+Fat1*^{KD} (p.CAG-GFP + Sh_FAT1 + sh_YAP). Quantification (moyennes ± SEM) du pourcentage de localisation des cellules GFP+ dans la VZ/SVZ, IZ et la CP, analysée par one-way ANOVA suivie du test de comparaisons multiples de Bonferroni (****P < 0,0001 ; contrôle n=15 ; *Fat1*^{KD} n=9 ; *Taz+Fat1*^{KD} n=10 ; *Yap+Fat1*^{KD} n=12)

Nos données ne permettent pas de conclure de manière définitive sur l'implication de Fat1 dans la voie de signalisation Hippo/Mst, en partie à cause de la faible réduction de l'expression de Yap et Taz obtenue avec nos ARN interférents, ce qui constitue une limite potentielle de cette étude. Nos résultats montrent l'inactivation simultanée des Yap et Taz avec Fat1 ne rétablit pas la migration radiaire.

DISCUSSION

Mes travaux de thèse ont mis en évidence de nouveaux rôles de la Flna et de Fat1 dans les étapes clés de la formation du cortex cérébral. Nous avons démontré que la Flna régule les processus de dendritogenèse en interagissant avec Arhgap24 pour réguler l'activité de Rac1 et la phosphorylation de la cofiline. De plus, la Flna est impliquée dans la spinogenèse et joue un rôle essentiel dans le maintien de l'équilibre entre les entrées synaptiques excitatrices et inhibitrices des neurones corticaux. Nos résultats suggèrent que, bien que intégrés au réseau, les neurones déficients en Flna présentent des altérations susceptibles de conduire à la formation de circuits corticaux dysfonctionnels. Ainsi, nos travaux apportent de nouvelles perspectives sur les mécanismes physiopathologiques sous-jacents aux PVNH, soulignant que l'altération des réseaux corticaux pourrait être à l'origine des manifestations cliniques observées chez les patients.

En parallèle, nous avons identifié un nouveau gène candidat potentiel, la cadhérine atypique FAT1, dans l'étiologie des PVNH. Mes travaux ont permis de caractériser un nouveau rôle de Fat1 dans les étapes précoces du développement cortical : Fat1 joue un rôle crucial dans la migration neuronale et la lamination corticale. Fat1 régule également la polarisation des neurones post-mitotiques et leur morphologie au cours du développement. De plus, Fat1 participe à la maturation neuronale en régulant la formation de l'arbre dendritique apical. Bien que le lien entre Fat1 et les PVNH reste à confirmer, nos résultats soulignent néanmoins l'importance de Fat1 dans des processus clés associés à l'apparition des PVNH, tels que les anomalies de migration neuronale et les altérations morphologiques des neurones intégrés dans les réseaux corticaux.

Ainsi, mes travaux de thèse ont permis de caractériser de nouvelles fonctions de la Flna et de Fat1 dans le développement cortical et leur rôle dans la formation des réseaux corticaux. Nos résultats mettent en avant que l'intégration des cellules déficientes dans ces réseaux est altérée, suggérant que dans le contexte des MCD, ces cellules participent à la genèse de circuits corticaux dysfonctionnels. Ces anomalies contribuent à l'apparition des manifestations cliniques tels que l'épilepsie. Ainsi, ces travaux apportent une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents aux MCD, soulignant que les altérations du cortex normotopique au même titre que l'hétérotopie participent à l'émergence des manifestations cliniques.

1. Les PVNH et altération du cortex normotopique

1.1 Comment les neurones déficients s'intègrent dans le cortex et participent à la formation des réseaux ?

Les PVNH sont associées sur le plan clinique à des épilepsies. Des analyses quantitatives sur des enregistrements SEEG de patients PVNH ont montré que dans la majorité des cas, les réseaux épileptogènes impliquent l'hétérotopie et le cortex normotopique, mais parfois seulement le cortex normotopique (Boulogne et al., 2022 ; Pizzo et al., 2017). Cela suggère que des réseaux corticaux dysfonctionnels n'impliquant pas les hétérotopies, peuvent être à eux seuls à l'origine des crises d'épilepsie. De plus, des défauts dans l'établissement d'une connectivité et de l'organisation corticale adéquate peuvent entraîner un déséquilibre de la balance excitatrice/inhibitrice, un mécanisme reconnu comme étant à la base de l'épilepsie (Bozzi et al., 2018 ; Okur et al., 2024 ; Staley, 2015).

Afin de déterminer si les neurones intégrés dans le cortex normotopique des patients PVNH présentent des altérations, nous avons étudié les conséquences d'une absence d'expression de la Flna dans la maturation des neurones situés dans les couches II-III chez la souris. Nos résultats montrent que la déplétion de la Flna entraîne une croissance excessive de l'arbre dendritique, altère la distribution des épines dendritiques et réduit les contacts synaptiques excitateurs. Une croissance dendritique correcte est fondamentale pour le bon fonctionnement neuronal, car la structure et l'étendue de l'arborisation dendritique déterminent le champ réceptif du neurone, élément clé de sa connectivité fonctionnelle (Hausser et al., 2000 ; Lanoue & Cooper, 2019). Ces modifications morphologiques peuvent entraîner des altérations des propriétés intrinsèques des neurones, pouvant causer des dysfonctionnements du réseau cortical (Magee, 2000 ; Nestor & Hoffman, 2012 ; Udvary et al., 2022). L'altération de la distribution des épines dendritiques et du nombre de contacts synaptiques excitateurs peuvent également contribuer à des dysfonctionnements du réseau cortical. Les épines et les synapses étant les supports de la transmission de l'information neuronale (Südhof, 2021), ces altérations peuvent entraîner un déséquilibre dans la balance excitatrice/inhibitrice, avec des conséquences délétères à l'échelle du réseau pouvant entraîner des manifestations cliniques tel que l'épilepsie (Bozzi et al., 2018 ; Okur et al., 2024 ; Staley, 2015).

Les défauts de migration neuronale ainsi que l'altération de la position finale des neurones au sein du cortex peuvent être associés à des réarrangements morphologiques (Falace et al., 2014 ; Ohshima et al., 2007 ; Runge et al., 2021). Nos résultats montrent que les neurones *Fat1*^{KD} présentent une augmentation du nombre et de la taille des dendrites apicales à P7 sans modification de l'arborisation basale. Dans un premier temps, il serait pertinent de vérifier si ces altérations morphologiques sont maintenues à un stade plus tardif, à P15 et P30, lorsque l'arbre dendritique a acquis sa morphologie terminale. Des défauts morphologiques de l'arbre dendritique pouvant également entraîner des anomalies dans la formation et la densité des épines dendritiques, ainsi qu'un déséquilibre entre les synapses excitatrices et inhibitrices, il serait pertinent d'étudier la densité et la morphologie des épines dendritiques ainsi que la distribution des synapses excitatrices et inhibitrices (Falace, Corbieres et al., 2024). Pour cela, nous pourrions utiliser des FingR *(« Fibronectin intrabodies generated with mRNA display »*) dirigés contre PSD95 ou Gephyrin, permettant de quantifier les synapses excitatrices et inhibitrices, respectivement (Falace, Corbieres et al., 2024 ; Gross et al., 2013). Par co-électroporation d'un FingR et d'un plasmide p.CAG-RFP, il serait possible d'étudier la distribution des entrées postsynaptiques excitatrices et inhibitrices.

Enfin, les réarrangements des paramètres morphologiques sont généralement associés à des altérations des propriétés intrinsèques qu'il serait intéressant d'étudier. Pour mieux caractériser les propriétés morpho-fonctionnelles des neurones Flna^{cKO} et Fat1^{KD}, il serait pertinent d'utiliser des techniques d'électrophysiologie en configuration « cellule entière » afin d'observer les propriétés intrinsèques et synaptiques de ces neurones. Les propriétés intrinsèques fourniraient des informations sur l'excitabilité de ces neurones, telles que leur potentiel de repos, la fréquence et le profil de décharge, ainsi que la résistance et la capacitance. Les propriétés synaptiques nous permettraient d'examiner les courants spontanés (sEPSC et sIPSC) et les courants miniatures (mEPSC et mIPSC). Afin de caractériser l'impact de ce déséquilibre sur le réseau cortical, il serait envisageable d'effectuer de l'imagerie calcique sur tranches afin de caractériser l'activité des assemblées de neurones et de comprendre la formation des réseaux épileptogènes au sein du cortex (Vermoyal et al., 2024). Ces expérimentations permettraient d'étudier l'activité neuronale à l'échelle du réseau et de mieux comprendre les conséquences fonctionnelles de ces réarrangements morphologiques.

En effet, les études sur des modèles murins de PVNH se concentrent principalement sur les neurones hétérotopiques ou l'intégration des hétérotopies dans le réseau, mais rarement dans l'étude du cortex normotopique et l'établissement des circuits corticaux dysfonctionnels. Cependant chez les patients PVNH, la majorité des crises proviennent du cortex normotopique ou de l'association de l'hétérotopie et du cortex normotopique (Boulogne & al., 2022 ; Pizzo & al., 2017) soulignant l'intérêt de comprendre comment l'hétérotopie participe et s'intègrent dans les réseaux mais également de caractériser les réarrangements des circuits du cortex normotopique. L'étude de Vermoyal et al. (2024) montre, à l'aide d'imagerie calcique sur des coupes de cerveau du modèle souris PVNH $RhoA^{cKO}$, qu'il n'y a pas de recrutement préférentiel entre l'hétérotopie et le cortex normotopique dans l'émergence des activités épileptiformes. En revanche, les neurones présents dans l'hétérotopies présentent des propriétés morpho-électriques anormales ainsi qu'une connectivité altérée susceptibles de contribuer aux différentes dynamiques de l'activité épileptiforme. Une étude menée sur un modèle de rat PVNH induit par injection d'acétate de méthylazoxyméthanole, a mis en avant sur des tranches *in vitro* que les décharges épileptiformes n'était jamais initiée par le nodule mais par les structures adjacentes telles que le cortex normotopique ou l'hippocampe confirmant les observations SEEG réalisé chez les patients PVNH (Tschuluun et al., 2011). De plus, les neurones présents dans les nodules reçoivent des entrées synaptiques en provenance de l'hippocampe et du néocortex et envoient des projections axonales vers ces structures, soulignant la grande intégration des hétérotopies dans les réseaux (Tschuluun et al., 2011). Ces données mettent en avant la capacité des neurones qui composent les nodules à favoriser la communication entre différentes structures cérébrales, bien qu'ils ne soient pas initiateurs de l'activité épileptiforme, ils contribuent fortement à la synchronisation des patterns de décharge aberrants. Ainsi, la grande connectivité entre les neurones de l'hétérotopie avec le cortex normotopique rend l'investigation des neurones intégrés dans le cortex normotopique d'autant plus pertinente pour améliorer la compréhension globale de l'apparition des circuits corticaux dysfonctionnels dans l'émergence des activités de réseaux aberrantes.

Mes résultats de thèse soulignent l'importance de Flna et Fat1 dans les étapes précoces du développement, mais également leur contribution aux étapes plus tardives dans la maturation neuronale et la formation des circuits corticaux. Ainsi, outre la

présence de nodules hétérotopiques résultant de défauts de migration neuronale, les défauts morphologiques des neurones du cortex normotopique semblent être une caractéristique importante des malformations corticales. En effet, ces altérations morphologiques, et probablement fonctionnelles, se développent également au sein du cortex normotopique. Dans le cas des mutations du gène *FLNA*, ces altérations pourraient représenter la base physiopathologique des crises d'épilepsie. Bien que le lien direct entre *FAT1* et les PVNH ne soit pas entièrement établi dans cette étude, nos résultats révèlent que les neurones déficients en Fat1 présentent des réarrangements morphologiques similaires à ceux observés dans le modèle *Flna*^{cKO}, renforçant son rôle potentiel dans ces malformations. Ainsi, cette étude souligne l'importance de la maturation neuronale dans l'établissement de réseaux corticaux fonctionnels et dans la genèse des malformations corticales, offrant une nouvelle perspective sur les mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces troubles.

1.2 Quel lien entre *FAT1* et les MCD ?

La dérégulation de la migration neuronale et l'altération de la position des neurones excitateurs au sein du cortex sont souvent associées à des troubles neurodéveloppementaux (Klinger et al., 2021). Ainsi, par son implication dans ces processus, l'ensemble de nos résultats suggèrent que Fat1 pourrait être lié à ces pathologies. Notre étude a débuté par l'investigation d'un cas clinique présentant des PVNH ainsi qu'une ventriculomégalie, qui présentait des mutations hétérozygote *compound* sur le gène *FAT1*. Nous avons alors investigué son rôle dans le développement cortical. Nos résultats montrent que la déplétion de *Fat1* entraîne des défauts de la migration neuronale. Dans le modèle *Fat1*$^{cKO\text{-}CAG\text{-}Cre}$, certains neurones présentent un arrêt total de migration à P2, avec des neurones situés dans les couches profondes laissant suggérer la présence de PVNH. De plus, notre étude a également mis en avant que dans le modèle *Fat1*^{KD} les neurones présentaient des altérations dans l'établissement de l'arbre dendritique tout comme dans le modèle *Flna* (Falace, Corbieres et al., 2024), suggérant un mécanisme partagé. En outre, un lien entre les PVNH et les cadhérines atypiques *Fat4* et *Dchs1* a déjà été établi, appuyant sur la relation entre les mutations des cadhérines atypiques et les PVNH (Cappello et al., 2013). L'inactivation de *Fat4* et *Dchs1* par injection d'ARN interférent et IUE engendre des retards de migration en embryonnaire (Cappello et al., 2013) similaires à ceux que nous observons dans nos différents modèles *Fat1*. Une

étude complémentaire, menée sur des organoïdes cérébraux humains dérivés de patients porteurs de mutations sur le couple récepteurs-ligands Fat4-Dchs1, montre également des retards de migration neuronale (Klaus et al., 2019). Plus récemment, il a été démontré sur ce même modèle d'organoïdes cérébraux, que Fat4-Dchs1 participent à l'établissement d'une activité neuronale adéquate et à la régulation de la morphologie neuronale (Matteo et al., 2024). En effet, les mutations de *Fat4* et de *Dchs1* entraînent une augmentation du taux moyen de décharge révélant une excitabilité neuronale accrue, ainsi qu'une augmentation des taux moyens de *burst* et de leur durée (Matteo et al., 2024). Ces défauts d'excitabilité cellulaire sont associés à une augmentation de la longueur totale des prolongements dendritiques et du nombre de nœuds, révélant une complexité morphologique accrue. Cela suggère que Fat4-Dchs1 modulent la morphologie neuronale (Matteo et al., 2024). Ces observations sont similaires à celles faites dans nos modèles *Flna* et *Fat1*, suggérant que des altérations morpho-fonctionnelles des neurones sont souvent associées aux PVNH. Cependant, bien que notre étude nous ait permis de découvrir que *Fat1* jouait différents rôles dans l'établissement cortical, notamment en régulant la migration neuronale, nous ne sommes pas en mesure de conclure si les mutations hétérozygotes *compound* sur le gène *FAT1* sont à l'origine de PVNH. Afin d'établir un tel lien, il faudrait identifier de nouveaux patients PVNH présentant des mutations sur le gène *FAT1*. Afin de valider cela *in vivo*, une possibilité serait de sur-exprimer par IUE la forme sauvage de *FAT1* dans le modèle *Fat1*^{cKO} dans le but de sauver le phénotype de migration. De plus, nous pourrions tester les formes mutées de *FAT1* afin de confirmer qu'elles ne restaurent pas le phénotype de migration. En revanche, cette approche comporte des limites expérimentales notamment en raison de la taille conséquente de la protéine FAT1 (environ 506 kDa), qui pourraient réduire l'efficacité de la transfection lors de IUE. Les plasmides codant pour des protéines de cette taille sont souvent moins bien intégrés dans les cellules, ce qui peut entraîner une expression plus faible ou instable. De plus, la taille du plasmide peut augmenter les risques de traduction partielle de la protéine, générant des fragments non fonctionnels. Il sera donc essentiel de prendre en compte ces limitations lors de l'interprétation des résultats.

Les patients atteints de PVNH présentent souvent des manifestations cliniques telles que de l'épilepsie, un déficit cognitif et des troubles du spectre autistique (TSA) (Parrini et al., 2016). Si nous n'avons pas pu établir de relation causale entre la présence de PVNH dans notre cas clinique et l'existence de mutations *compound* sur le gène *FAT1*,

une étude a identifié des mutations *compound* sur le gène *FAT1* chez des patients souffrant d'épilepsies focales partielles et de crises tonico-cloniques généralisées peu fréquentes (Zou & al., 2023). Des crises d'épilepsie spontanées ont également été observées dans le modèle souris $FAT1^{flx/flx}NESTINE^{CRE}$ (Françoise Helmbacher, communication personnelle). Afin de pouvoir établir un lien entre Fat1 et épilepsie, il serait intéressant de déterminer si les souris $Fat1^{flx/flx}EMX1^{CRE}$ développent des crises d'épilepsie spontanées à l'âge adulte en effectuant des enregistrements EEG *in vivo* sur celles-ci (Sahu et al., 2019).

Enfin, une étude a également établi un lien entre la présence de mutations sur le gène *FAT1* et les TSA (Costa et al., 2021 ; Cukier et al., 2014 ; Frei et al., 2021 ; Hernando-Davalillo et al., 2022). Bien que nous n'ayons pas étudié si nos souris développaient un comportement de type TSA il est intéressant de noter que des défauts de lamination corticale ont été observées dans des modèles murins d'autisme (Runge et al., 2021 ; Toolan et al., 2000). Afin d'explorer si notre modèle présente des comportements suggestifs de TSA, il serait pertinent de réaliser des tests de comportementaux sur ces souris. Les TSA se caractérisent par un spectre très large de déficits comprenant des atteintes des interactions sociales réciproques, des altérations de la communication ainsi que des comportements répétitifs (D.S.M.-5, 2013 ; Folstein & Rosen-sheidley, 2001 ; Silverman et al., 2010). Bien que la mise en place de tâches comportementales pour caractériser les TSA chez la souris soit un défi, plusieurs tests existent pour examiner ces critères comportementaux (Silverman et al., 2010). Ainsi, pour évaluer si notre modèle Fat1 peut être associé aux TSA, il faudrait évaluer les interactions sociales à travers des tests d'interaction sociale réciproque, d'approche sociale, et de préférence sociale. Enfin, pour explorer les comportements répétitifs, des tests portant sur les comportements stéréotypés, répétitifs et les intérêts restreints seraient nécessaires (Silverman et al., 2010).

Bien que le lien direct entre les mutations du gène *FAT1* et les PVNH ne soit pas encore établi, le rôle de *Fat1* dans des étapes cruciales du développement cortical mis en évidence dans nos modèles murins, ainsi que son implication dans des pathologies associées aux PVNH, suggère une possible contribution de ce gène à l'étiologie de ces malformations. De nombreuses études ont mis en évidence des associations entre les gènes codant les membres de la superfamille des cadhérines et des troubles neuropsychiatriques, tels que des troubles cognitifs (*CDH15, PCDH19*) (Bhalla et al., 2008;

Dibbens et al., 2008), des TSA (*CDH5, CDH8, CDH9, CDH10, CDH11 CDH13, PCDH10, PCDH19, PCDHb4*) (Dibbens et al., 2008 ; Gerosa et al., 2019 ; Morrow et al., 2008 ; O'Roak et al., 2012 ; Pagnamenta et al., 2011 ; Sanders et al., 2011 ; K. Wang et al., 2009), des troubles du déficit de l'attention (*CDH13*) (Salatino-Oliveira et al., 2015) ainsi que des troubles bipolaires (*FAT1, CDH7*) (Abou Jamra et al., 2008 ; Blair et al., 2006 ; Sklar et al., 2008) et de la schizophrénie (*CHD12, CDH18, PCDH12*) (Gregório et al., 2009; Singh et al., 2010 ; Rewied in Hawi et al., 2018 ; Redies et al., 2012). Ces données soulignent l'importance des cadhérines dans la médiation des interactions cellule-cellule et dans l'établissement du cortex cérébral. En effet, le dysfonctionnement du système d'adhérence basé sur les cadhérines peut perturber le développement des circuits neuronaux, contribuant potentiellement à l'apparition de trouble neuropsychiatriques (Hawi et al., 2018 ; Redies et al., 2012). Bien que ces études doivent être interprétées avec prudence, car des mutations pathogènes n'ont pas encore été clairement identifiées pour la plupart de ces gènes, la superfamille des cadhérines présente un intérêt particulier dans les troubles neuropsychiatriques, renforçant ainsi le rôle crucial de l'adhérence entre cellules dans le développement du cortex cérébral.

2. Fat1 régule la migration neuronale et participe à la lamination corticale

Mes travaux de thèse ont permis de découvrir un nouveau rôle de la cadhérine atypique Fat1 dans la régulation de la migration radiale. Nos résultats montrent que la déplétion de Fat1 entraîne un retard transitoire de la migration durant la phase embryonnaire. Ces altérations s'accompagnent de défauts d'orientation des neurones post-mitotiques à E16.5 et de réarrangements morphologiques au cours des étapes de migration embryonnaire, suggérant un retard de la transition multi-bipolaire (TMB). En revanche, à des stades plus tardifs, les neurones sur-migrent au sein de la CP. L'ensemble de ces observations ouvrent de nombreuses perspectives sur les mécanismes sous-jacents et les partenaires d'interaction potentiels de Fat1 qui pourraient être impliqués dans la régulation de ces processus.

Le lien entre les cadhérines et la régulation des différentes étapes de la migration neuronale a déjà été étudié dans la littérature. Tout comme Fat1, la N-cadhérine (Cdh2) régule la migration radiaire (Ito & Kawauchi, 2024 ; Martinez-Garay, 2020). Cdh2 participe

à l'orientation radiale des neurones multipolaires (Jossin & Cooper, 2011), favorise l'adhérence cellulaire aux RGA et la locomotion en permettant la translocation du noyau (Martinez-Garay et al., 2016 ; Shikanai et al., 2011), ainsi qu'au processus de translocation terminale (Franco et al., 2011). Les fonctions de Cdh2 sont également régulées par la Reelin sécrétée par les CR (Franco et al., 2011 ; Jossin & Cooper, 2011 ; Yang et al., 2019). La Reelin en se fixant sur son récepteur Dab1, elle permet d'activer Rap1 qui régule l'expression de Cdh2 et l'attachement du prolongement de guidage aux RGa (Franco et al., 2011 ; Jossin & Cooper, 2011 ; Yang et al., 2019). Une étude a également montré que la Reelin augmentait l'expression de Cdh2 de manière transitoire durant la translocation neuronale, mais le mécanisme à l'origine de cette augmentation demeure méconnu (Matsunaga et al., 2017). De plus, la régulation de Cdh2 est nécessaire au positionnement final des neurones, sa surexpression entraine une sur-migration des neurones au sein de la CP (Matsunaga et al., 2017). Ainsi, la voie Reelin/Rap1/Cdh2 participe à la régulation de la migration neuronale (Franco et al., 2011 ; Jossin & Cooper, 2011 ; Yang et al., 2019). D'autres cadhérines telles que Pcdh12, Fat4 et Dchs1 participent également à la régulation de la migration neuronale (Cappello et al., 2013 ; Rakotomamonjy et al., 2023). Enfin, les cadhérines Cdh11, Fat4 et Dchs participent également à la régulation du processus de maturation (Frei et al., 2021 ; Matteo & al., 2024). Ensemble, ces résultats montrent l'importance notable des cadhérines dans la régulation de nombreux processus du développement cortical. Certaines cadhérines participent à la régulation de la migration neuronale et d'autres au processus de maturation. Mes résultats de thèse s'inscrivent dans la continuité de ces découvertes, confirmant le rôle essentiel des cadhérines dans la corticogenèse. Ces travaux démontrent pour la première fois l'implication de la cadhérine atypique Fat1 comme acteur essentiel de cette corticogenèse. Ces résultats renforcent l'implication de ces molécules d'adhérence cellulaire dans la régulation de ces processus déterminants pour l'établissement cortical.

2.1 L'expression de Fat1 dans les structures cruciales à l'établissement cortical participe-t-elle à la régulation de la migration radiale ?

Il est établi que les cellules de la glie radiaire (RGa), les neurones de la sous-plaque (nSP) et les cellules de Cajal-Retzius (CR) sont des cellules piliers dans l'établissement cortical. Les RGa assurent la production de l'ensemble des neurones excitateurs du cortex

et sont indispensables au processus de migration radiale, permettant aux neurones de migrer le long de leur prolongement basal (Nadarajah et al., 2001 ; Smart, 1973). Les nSP forment une couche située à la frontière de la IZ et de la CP. Ils participent également à la régulation de la TMB (Luhmann et al., 2018 ; Ohtaka-Maruyama et al., 2018). Les cellules de Cajal-Retzius (CR) sont indispensables à l'établissement de la lamination corticale. Elles sécrètent la Reelin qui guide les neurones vers leur position finale (D'Arcangelo et al., 1995 ; Ogawa et al., 1995). Ainsi, ces trois types cellulaires jouent des rôles essentiels dans l'établissement cortical, la régulation des différentes étapes de la migration radiale et le positionnement final des neurones. Fat1 est exprimé dans ces trois types cellulaires durant le développement embryonnaire et à certains stades post-nataux, amenant l'hypothèse de sa participation à la régulation de la migration neuronale à travers son expression dans ces types cellulaires.

En effet, nos résultats montrent que l'inactivation de *Fat1* entraîne un retard transitoire de la migration durant la période embryonnaire, avec un arrêt de migration en dessous de la SP. Ces altérations s'accompagnent de défauts morphologiques des neurones *Fat1*^{KD} dans la IZ, avec des neurones post-mitotiques qui acquièrent une morphologie circulaire plus tardivement que les neurones contrôles. Ces altérations pourraient être liées à un retard de la TMB, expliquant ainsi le retard transitoire de migration observé dans la IZ des cellules bloquées sous la SP. Pour examiner plus précisément ce processus, des expériences de *Live Imaging* pourraient permettre de visualiser et caractériser ce retard dans la TMB (Boitard et al., 2015 ; Epifanova et al., 2021). Ces altérations pourraient résulter d'un défaut de communication entre les neurones en migration et les nSP. Ceci soulève l'hypothèse de la capacité de Fat1 à établir des liaisons homophiliques. Il est établi que la plupart des cadhérines ont la capacité de réaliser des liaisons homophiliques, c'est-à-dire qu'elles peuvent interagir avec entre elles (Boggon et al., 2002). Une possibilité serait que l'interaction homophilique Fat1-Fat1 entre les neurones en migration et les nSP favorise la TMB et facilite l'entrée des neurones dans la CP. Bien que cette interaction puisse accélérer la TMB, elle ne semble pas être strictement nécessaire, car les neurones parviennent à migrer dans la CP par la suite. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant d'inactiver *Fat1* dans les nSP via une IUE à E10,5 (Yoshinaga et al., 2021), afin de voir si ce retard transitoire de migration est reproduit. La visualisation d'interactions homophiliques en *trans* entre les protocadhérines a déjà été explorée par la technique de FRET (*Förster resonance energy*

transfer) en culture cellulaire (Hoshinoa et al., 2023 ; Kanadome et al., 2021). Cette technique permet d'étudier les interactions entre deux partenaires moléculaires en mesurant le transfert d'énergie entre deux fluorophores, lorsque ceux-ci sont suffisamment proches pour que le premier fluorophore, excité par une certaine longueur d'onde, transfère son énergie au second fluorophore, qui émet alors une fluorescence à une longueur d'onde différente. Cette technique permettrait d'étudier la capacité de Fat1 à réaliser des liaisons homophiliques et ainsi renforcer l'hypothèse d'interactions entre les cellules en migration et les nSP.

L'existence d'interactions homophiliques Fat1-Fat1 pourrait également expliquer les défauts d'établissement des neurones au sein de la CP. En effet, nos résultats montrent que les neurones *Fat1*^{KD} et *Fat1*^{cKO} présentent des anomalies de positionnement dans le cortex, soit une sur-migration des neurones, soit une migration retardée, respectivement. Nous avons observé que la délétion de Fat1 dans les neurones post-mitotiques *Fat1*$^{cKO\text{-}NeuroD1\text{-}Cre}$ ne perturbe pas la migration radiaire mais altère la position finale des neurones. Cela suggère que le retard de migration et la position finale des neurones sont des mécanismes indépendants, et que Fat1 participe à la translocation terminale des neurones permettant leur positionnement final au sein de la CP. Ce processus, régulé par la Reelin sécrétée par les CR, peut également être médiées par des interactions entre les CR et les neurones en migration (Gil-Sanz et al., 2013 ; Sekine et al., 2011 ; Sekine et al., 2012). En effet, il a déjà été démontré que les CR interagissent avec les neurones en migration par le biais de liaisons homophiliques avec CDH2 et de liaisons hétérophiliques entre Nectine-1 et Nectine-2 exprimées par les CR et les neurones en migration respectivement (Gil-Sanz et al., 2013). Ces interactions favorisent la translocation terminale et permettent le bon positionnement des neurones en migration (Franco et al., 2011 ; Gil-Sanz et al., 2013). De plus, Fat1 est exprimé au niveau des filopodes et des lamellipodes (Tanoue & Takeichi, 2004), ce qui renforce l'idée que des contacts entre les prolongements de guidage des neurones et les CR seraient possibles. Il serait donc intéressant d'étudier si la translocation terminale est favorisée par les interactions homophiliques Fat1-Fat1 entre les neurones en migration et les CR. Une approche permettant de tester cette hypothèse pourrait être de dépléter Fat1 spécifiquement dans les CR, en utilisant un modèle *Fat1*$^{flx/flx}$ Δnp73 ^{CRE} (Tissir et al., 2009), puis d'observer, grâce à l'injection de GFP par EIU ciblant les neurones des couches superficielles, si le phénotype d'altération de la position finale des neurones est reproduit.

Ces investigations permettraient de mieux comprendre le rôle de Fat1 dans ces différents types cellulaires et de déterminer si elle participe à la régulation de la migration radiale par le biais d'interactions homophiliques.

2.2 Par quelle voie de signalisation ou de partenaires d'interactions Fat1 régule la migration radiaire ?

Notre étude montre que *Fat1* joue un rôle dans le processus de migration et dans le positionnement final des neurones au sein du cortex somatosensoriel. Les altérations de la migration neuronale causées par l'inactivation de Fat1 s'accompagnent de défauts morphologiques. Les cellules dans la zone intermédiaire (IZ) acquièrent tardivement une morphologie circulaire, un phénomène possiblement lié à un dysfonctionnement de la TMB. Ainsi, les défauts migratoires observés après la délétion de Fat1 dans les neurones pourraient être attribués à la perte de ses interactions avec des partenaires de liaison, ou de son incapacité à transduire le signal pour moduler des voies de signalisation.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la voie de signalisation Hippo/Mst car Fat1 participe à son activation (Ahmed et al., 2015 ; Martin et al., 2018 ; Peng et al., 2021). Hippo/Mst, via l'effecteur *Yap*, participe à la régulation de la migration neuronale avec *Fat4* (Cappello et al., 2013). Cette étude montre que le retard de migration est sauvé par la co-injection d'un ARN interférent dirigé contre *Fat4* et d'un micro-ARN dirigé contre *Yap* (Cappello et al., 2013). Dans notre étude, nous avons voulu observer si la déplétion de *Fat1* combinée avec celle de *Yap* ou *Taz* pouvait corriger le retard de migration. Nos résultats montrent que lors de la déplétion simultanée de *Taz* et de *Fat1* (*Taz + Fat1*^{KD}) produit un phénotype similaire à celui observé lors de la déplétion seule de *Fat1* (*Fat1*^{KD}), la migration n'étant pas restaurée mais pas davantage affectée par cette double inactivation. En revanche, la déplétion de *Yap* et de *Fat1* (*Yap + Fat1*^{KD}) induit un phénotype migratoire plus sévère, avec une augmentation du nombre de neurones *Yap + Fat1*^{KD} bloqués dans la IZ, comparé aux neurones *Fat1*^{KD}. Nos résultats diffèrent de ceux obtenus pour *Fat4* et *Yap* (Cappello et al., 2013) et peuvent suggérer que l'interaction de *Fat1* avec *Yap* ait des conséquences opposées à celles entre *Fat4 et Yap*. Pour explorer cette hypothèse, il serait pertinent de réaliser des IUE en utilisant une forme constitutivement active de *Yap*, telle que sa forme phosphorylée, afin de déterminer si cela restaure le phénotype de migratoire.

La régulation de la migration radiaire pourrait également dépendre de l'interaction du domaine intracellulaire de Fat1 et du complexe Ena/Vasp (Moeller et al., 2004 ; Scott et al., 2005 ; Tanoue & Takeichi, 2004). Les protéines Ena/Vasp jouent un rôle clé dans l'allongement des F-actine en stimulant leur nucléation et en orchestrant leur organisation en structures complexes (Faix & Rottner, 2022). D'une manière plus générale, Ena/Vasp régule la dynamique de l'actine en se liant au cytosquelette d'actine et régule la polarisation cellulaire (Moeller et al., 2004 ; Scott et al., 2005 ; Tanoue & Takeichi, 2004), mais il participe également à la dynamique des lamellipodes en favorisant la protrusion de la membrane cellulaire, à l'adhérence et la motilité cellulaire (Bear et al., 2002 ; Faix & Rottner, 2022 ; Rottner et al., 1999 ; Samarin et al., 2003). Au niveau de la cellule, le complexe Ena/Vasp se situe à l'extrémité du processus de guidage des neurones, au niveau des filopodes et participe à leur formation et leur élongation (Faix & Rottner, 2022 ; Kwiatkowski et al., 2007 ; Lebrand et al., 2004). De plus, Ena/Vasp régule la dynamique morphologique des neurones multipolaires en migration et participe également à leur formation (Yoshinaga et al., 2012). Contrairement aux autres cadhérines, Fat1 se localise dans les cellules au niveau des structures où l'actine est fortement renouvelée, tel qu'au niveau des filopodes, des lamellipodes et également au niveau des contacts cellule-cellule en culture cellulaire (Moeller et al., 2004 ; Tanoue & Takeichi, 2004). De plus, Fat1 est requis dans l'organisation correcte de l'actine (Tanoue & Takeichi, 2004), renforçant l'hypothèse que l'interaction avec Ena/Vasp participe à la polarisation cellulaire mais pourrait également réguler la morphologie et la motilité cellulaire. Il est donc possible que le retard dans l'acquisition d'une morphologie circulaire, suggérant un un retard de la TMB dans le modèle *Fat1*^{KD}, résulte de la perte d'interactions entre Fat1 et Ena/Vasp. De plus, les protéines Ena/Vasp sont exprimées dans le cortex en développement, notamment dans les CR et dans la IZ (Goh et al., 2002), deux zones corticales où l'expression de Fat1 est également renforcée. L'inactivation de Ena/Vasp entraîne un positionnement aberrant des neurones dans les couches plus superficielles (Goh et al., 2002 ; Kwiatkowski et al., 2007). Ces données vont dans le même sens que de nos observations concernant Fat1, renforçant la potentielle implication de l'interaction Fat1-Ena/Vasp dans le positionnement des neurones au sein de la CP. De plus, Ena/Vasp interagit également avec RIAM, une molécule adaptatrice qui se lie à Rap1-GTP (Lafuente et al., 2004). Rap1 participe à la régulation du processus de la migration radiaire en modulant Cdh2 (Franco et al., 2011 ; Jossin & Cooper, 2011 ; Yang et al., 2019), renforçant ainsi l'idée que Ena/Vasp se lie à des molécules clés impliquées dans la migration radiaire

mais également indiquant un rôle potentiel de Ena/Vasp/Rap1. Une seconde hypothèse serait que la migration des neurones multipolaires et la translocation terminale régulée par Reelin/Rap1/Cdh2 puissent également impliquer le complexe Fat1/Ena/Vasp. En effet, l'inactivation de Ena/Vasp induit une sur-migration des neurones au sein de la CP comme observé dans notre modèle *Fat1*^{KD}. Ces défauts pourraient être expliqué que la perte d'interaction entre Fat1 et Ena/Vasp pouvant entrainer des défauts d'activation de la voie Rap1. Ainsi, il serait pertinent d'étudier si l'interaction de Fat1 avec le complexe Ena/Vasp peut restaurer la migration radiale et le retard possible de TMB durant les stades embryonnaires. L'injection par IUE d'Ena/Vasp sous une forme constitutivement active, associée à l'inactivation de *Fat1,* pourrait restaurer le phénotype.

Enfin, bien que nos données puissent suggérer une interaction homophilique entre Fat1-Fat1 dans la régulation de la migration neuronale, les interactions hétérophiliques ne sont pas exclues. En effet, l'interaction entre Fat1 et Gypican-3 (Gpc-3) pourrais également participer à la régulation de la migration radiaire. Il a été récemment montré par une co-immunoprécipitation que le domaine extracellulaire, les 2ème-5ème motifs EGF-like, de Fat1 interagit avec glypican-3 (Gpc3) dans les cellules de carcinome hépatocellulaire (HCC) (Meng et al., 2021). Dans ces cellules, l'interaction Fat1-Gpc3 régule la migration des HCC (Meng et al., 2021). Gpc3 est un protéoglycane, une protéine ancrée dans la membrane cellulaire par un lien glycosylphosphatidylinositol (Filmus, 2022). Il est intéressant de noter que Gpc3 a la capacité d'inhiber la signalisation de Yap, un partenaire de Fat1 (Gao et al., 2015). Des mutations sur le gène *GPC3* sont associées au syndrome de Simpson-Golabi-Behmel, une maladie congénitale associée entre autres à de la macrocéphalie, de la déficience intellectuelle modérée et un patient a été rapporté avec une ventriculomégalie (Cottereau et al., 2013 ; Shimojima et al., 2016). Pour rappel, durant la migration neuronale, Gpc3 interagit en *trans* avec UNC5 (Akkermans et al., 2022). Cette interaction ligand-récepteur participe à la migration radiale des neurones, et leur inactivation entraîne un retard de migration dans la IZ avec des neurones qui ne parviennent pas à rentrer dans la CP (Akkermans et al., 2022). Gpc3 est exprimé précocement à E10.5 au niveau de la jonction du télencéphale et du diencéphale (Luxardi et al., 2007), et notamment dans les RGa durant le développement (Akkermans et al., 2022). De plus, Gpc3 est un régulateur négatif de la voie de signalisation SHH pendant le développement embryonnaire en rentrant en compétition avec Ptch1 à la membrane et entrainant l'endocytose et la dégration de SHH (Capurro et al., 2008 ; Filmus, 2022). Dans

les souris Gpc3^{Ko}, la voie de signalisation SHH est augmentée (Capurro et al., 2008). Or, l'activation aberrante de la voie de signalisation SHH promeut la différenciation des neurones de la couche IV et entraîne également une sur-migration de ces neurones au sein de la CP (Oishi et al., 2022), recoupant des observations similaires que nous avons fait dans notre modèle Fat1^{KD}. Ainsi, une autre hypothèse serait que Fat1 se lie à Gpc3 pour réguler la migration radiaire, en modulant la voie de signalisation SHH. Dans un premier temps, pour valider cette interaction Fat1-Gpc3, une co-immunoprécipitation sur du tissu cérébral serait nécessaire. Une validation à l'aide de la technique de *Proximity Ligation Assay* (PLA), déjà utilisée au sein de mon équipe (Mathieu et al., 2024), nous permettrait de visualiser l'interaction des protéines Fat1-GPC3 *in vivo*. Ensuite, l'étude de l'interaction par cristallographie, comme dans de l'article de Akkermans et al. (2022), nous permettrait de déterminer les sites d'interaction entre Fat1 et GPC3, afin de générer une protéine GPC3 mutée sur les sites de liaison pour Fat1. L'objectif est de valider cette interaction en surexprimant la forme mutée de GPC3 par IUE, afin d'observer si cela entraîne un phénotype migratoire similaire à celui observé dans le modèle *Fat1*^{KD}.

2.3 Quel est l'impact d'une translocation terminale anormale des neurones glutamatergiques sur l'établissement cortical ?

Nos résultats montrent que la déplétion de Fat1 à l'échelle cellulaire induit une altération du positionnement final des neurones. La déplétion de Fat1 dans les neurones post-mitotiques (*Fat1*$^{cKO\text{-}NeuroD1\text{-}CRE}$) n'entraîne pas de retard de migration durant les stades embryonnaires mais altère le positionnement final des neurones. Ces résultats indiquent que la translocation terminale est également un processus impacté par la délétion de Fat1, et ces altérations sont observées indépendamment du retard de migration. Pour cette raison, nous avons décidé d'étudier le rôle de Fat1 dans l'organisation laminaire du cortex. Nos résultats montrent que la délétion de Fat1 principalement dans les neurones excitateurs (modèle *Fat1*$^{flx/flx}$ EMX1^{CRE}) engendre un épaississement du cortex ainsi qu'un déplacement de l'intégralité des couches corticales en direction de la surface piale. L'implication des cadhérines dans l'établissement de la lamination corticale et dans le positionnement final des neurones n'a été que peu étudiée. Matsunga et al., ont montré que la surexpression de la Cdh2 dans les neurones des couches superficielles par IUE à E14.5 entraîne une sur-migration de ces neurones vers la surface piale à P7 (Matsunga et al., 2017). Il est intéressant de noter que nos résultats sont

similaires lors de la déplétion du gène *Fat1,* ce qui pourrait suggérer un rôle antagoniste de ces deux cadhérines dans la lamination corticale. Il serait donc pertinent de tester la surexpression de Fat1 par IUE, néanmoins pour cause de limitation technique au vu de la taille conséquente des transcrits (15-16 Kb), nous n'avons pas pu tester cette hypothèse pour le moment. De plus, le knockdown de la protocadhérine Pcdh20 à E14.5 dans les progéniteurs neuronaux entraîne également une sur-migration des neurones de la couche IV vers les couches plus superficielles à P7. Ces observations soutiennent un rôle crucial des cadhérines et de Fat1 dans le positionnement final des neurones.

De manière surprenante, l'augmentation de la taille du cortex somatosensoriel dans le modèle *Fat1*$^{flx/flx}$ EMX1^{CRE} n'est pas accompagnée d'une augmentation du nombre de neurones (NeuN^{+}) par rapport aux souris contrôles. Cependant, nous observons des changements d'identités neuronales, avec une augmentation du nombre de neurones exprimant le marqueur de la couche IV Rorβ et celui des couches V-VI Ctip2. Ces mêmes modifications ont été observées à P7 dans le knockdown de Pcdh20, où les auteurs constatent une diminution des neurones Rorβ^{+} et une augmentation des neurones exprimant le marqueur des couches superficielles Lhxh2^{+} (Oishi, et al., 2016). Cependant, ils n'ont pas quantifiés le nombre de neurones (NeuN^{+}) (Oishi, et al., 2016). Ces résultats suggèrent que les cadhérines participent également à l'acquisition de l'identité neuronale. La spécification et la différenciation des neurones dépendent des marqueurs moléculaires qu'ils expriment. Ces marqueurs sont souvent des facteurs de transcription qui régulent les caractéristiques moléculaire, morphologiques et physiologiques des neurones pour générer leur grande diversité (Konstantinides et al., 2018 ; Santiago & Bashaw, 2014). Par conséquent, des modifications des caractéristiques moléculaires peuvent impacter l'acquisition de l'identité neuronale finale. Par exemple, la déplétion du gène *Rorβ* par ARN interférent à E14.5 engendre une augmentation du nombre de neurone exprimant le marqueur des couches II-III Brn2 (Oishi et al., 2016). Ces auteurs montrent également qu'une expression ectopique de Rorβ dans les neurones augmente le nombre de neurones Rorβ^{+} et, par conséquent, diminue le nombre de neurones Brn2^{+} (Oishi et al., 2016). Nos résultats dans le modèle *Fat1*$^{flx/flx}$ EMX1^{CRE} montrent également une augmentation du nombre de neurones Rorβ^{+}. Il serait dont intéressant de contrôler dans notre modèle le nombre de neurones des couches II-III en testant le marqueur Brn2+. Ces données nous permettraient de confirmer le rôle de Fat1 dans la spécification neuronale. D'autre part, le KO du gène *Satb2*, un marqueur des couches superficielles, entraîne une augmentation

des neurones exprimant Ctip2^{+}, accompagnée par une diminution des projections thalamo-corticales et d'une augmentation les projections sous-cérébrales (Alcamo et al., 2008 ; Britanova et al., 2008 ; McKenna et al., 2015). De manière intéressante, nous avons observé une diminution des neurones exprimant le marqueur Satb2^{+} dans notre modèle *Fat1*^{KD}, ce qui pourrait expliquer l'augmentation du nombre de neurones exprimant le marqueur Ctip2. En complément de ces expériences, il serait intéressant d'identifier les voies moléculaires perturbées dans le modèle *Fat1*^{KO} en réalisant des analyses transcriptomiques à l'échelle cellulaire du type scRNA-seq, ce qui nous permettrait d'obtenir des informations sur les voies moléculaires modulées par Fat1.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats mettent en évidence le rôle crucial de la famille des cadhérines, et en particulier de Fat1, dans le positionnement final des neurones et l'acquisition d'une identité neuronale appropriée en fonction de la couche corticale où ces neurones s'intègrent.

En résumé, nos résultats supportent que la cadhérine atypique Fat1 joue un rôle clé dans la migration neuronale, la lamination corticale et la spécification de l'identité neuronale. Cela renforce l'importance des interactions cellules-cellules dans le développement et l'organisation du cortex cérébral. De ce fait, les molécules d'adhérence et la communication cellulaire apparaissent comme des mécanismes essentiels à l'établissement correct de la structure corticale.

Conclusions générales et perspectives

Ainsi mes travaux de thèse ont porté sur deux projets principaux : l'étude de la relation entre les PVNH et l'établissement d'un cortex normotopique dysfonctionnel, en explorant le rôle de la Flna dans la maturation neuronale et l'investigation d'un nouveau gène potentiellement lié aux PVNH, la cadhérine atypique Fat1, et la découverte de son rôle dans le développement cortical. Nos résultats ont mis en évidence une caractéristique commune à la déplétion de ces deux protéines, à savoir leur rôle dans les processus de maturation neuronale notamment de la croissance de l'arbre dendritique. Cette découverte souligne l'importance de la maturation neuronale dans l'établissement de réseaux corticaux fonctionnels et, par extension, un potentiel rôle dans la genèse des manifestations cliniques associées aux PVNH. L'autre partie de mes travaux de thèse a permis d'établir un nouveau rôle et de souligner l'importance de la cadhérine atypique Fat1 dans le développement cortical. Ces données renforcent ainsi le rôle crucial de l'adhérence cellule-cellule médiée par la superfamille des cadhérines dans la formation du cortex, ouvrant également de nouvelles perspectives sur leur implication dans les pathologies neurodéveloppementales. Pour aller plus loin, il serait pertinent d'explorer les mécanismes moléculaires dans le but de faire émerger des partenaires d'interaction ou des voies de signalisation communes entre Fat1 et Flna. De plus, l'analyse de l'activité de réseau et des propriétés intrinsèques des neurones dans ces modèles de malformation corticale pourraient apporter des informations cruciales sur la manière dont ces anomalies structurelles conduisent à des troubles neurodéveloppementaux tels que l'épilepsie.

ANNEXES

Annexe 1

Inferring Ligand-Receptor Interactions between GABAergic and Glutamatergic

Rémi Mathieu[1], Léa Corbières[1], Tangra Draia-Nicolau[1], Annousha Govindan[1], Vianney Bensa[1], Emilie Pallesi-Pocachard[1], Alfonso Represa[1], Carlos Cardoso[1], Ludovic Telley[2*], Antoine de Chevigny[1*]

[1] INMED, INSERM UMR1249, Aix Marseille University, Parc Scientifique de Luminy, Marseille, France

[2] Department of Fundamental Neurosciences, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

* Corresponding authors.

BioRxiv, Available online 3 September 2024

Problématique : La formation du cortex cérébral repose sur une séquence d'évènements embryonnaires et postnataux coordonnés, qui assurent le bon positionnement des différents sous-types neuronaux ainsi que l'établissement d'une connectivité synaptique adéquate. Le cortex cérébral abrite une grande diversité de neurones excitateurs glutamatergiques et de neurones inhibiteurs GABAergiques, chacun subdivisée en sous-types avec des caractéristiques uniques et qui exprimant des molécules secrétées ou d'adhérences spécifiques. L'allocation spécifique des interneurones GABAergiques et leur recrutement au sein des couches corticales pourraient être gouverné par un code moléculaire de type ligand-récepteur (LR) entre les neurones GABAergiques et glutamatergiques. Cependant, les mécanismes moléculaires responsables de cette organisation complexe et les partenaires d'interactions qui favorisent cette lamination spécifique demeurent encore peu connus. Dans cette étude, nous visions à examiner les paires de LR impliqués dans le regroupement préférentiel et à l'origine d'une connectivité spécifiques entre les différents types cellulaires de neurones glutamatergiques et GABAergiques.

Méthodes : Afin de répondre à cette problématique, nous avons effectué des expériences de scRNA-seq et de snRNA-seq sur le cortex somatosensoriel de souris pendant la période critique d'invasion du néocortex par les neurones GABAergiques (P0, P2, P5, P8) puis de l'établissement de la connectivité synaptiques (P8, P16, P30). En addition de ces échantillons collectés, des expériences de scRNA-seq publiées dans la littérature, réalisées à des stades plus précoces ou plus tardifs, ont été ajoutées afin de couvrir l'ensemble du développement cortical. Après analyse des résultats, les couples LR d'intérêt ont été testés par IUE à des âges embryonnaires précis pour cibler la couche corticale adéquate. Les images acquises au microscope confocal ont ensuite été reconstruites en 3D et analysées avec le logiciel IMARIS.

Résultats principaux : En utilisant des outils bio-informatiques avancés, les principaux types cellulaires de neurones glutamatergiques et GABAergiques ont été identifiés. La dynamique transcriptionnelle de ces différents types cellulaires a ensuite été analysée de E11.5 à P30. Nous avons inféré les interactions LR entre neurones GABAergiques et glutamatergiques sur la période de E18.5 à P30, période durant laquelle les neurones GABAergiques atteignent leurs positions laminaires (E18.5 à P8) et établissent leurs connexions synaptiques (P8 à P30). Ces résultats nous ont permis de construire un atlas

permettant notamment de visualiser l'expression spatiotemporelle de tous les gènes dans chaque sous-type de neurones corticaux identifiés, le nombre d'interaction et les couples LR impliqués dans ces interactions entre les neurones GABAergiques et glutamatergiques. Ces molécules pourraient être impliquées dans le regroupement préférentiel et la connectivité spécifique des neurones corticaux. Une analyse générale du nombre de couples LR prédits entre tous les types cellulaires de neurones GABAergiques et glutamatergiques a montré que le nombre de couples LR spécifique à un couple de type cellulaires donnée était très faible, que ceux partagés de manière large (par plus de 400 couples de type cellulaire) étaient peu communs (avec un peu moins de 30). En revanche, les couples LR partagés par moins de 10 couples de type cellulaires étaient plus fréquents (avec un maximum de 60). Cela suggère qu'un ensemble divers de couples LR gouverne un recrutement préférentiel et une connectivité spécifique entre les différents sous-types de neurones corticaux. Pour valider l'unité de cet atlas, nous montrons qu'il confirme des interactions déjà connues (Ngr3-Erbb4), complète des connaissances en identifiant des récepteurs associés dans des paires de cellules bien caractérisées (Cbln4-Neo1) et permet de découvrir de nouvelles paires de LR jouant un rôle dans l'inhibition périsomatique dans les couches corticales profondes et superficielles (Cdh13-Cdh13 et Pcdh8-Pcdh8, respectivement).

Dans cette étude, j'ai réalisé les IUE. Les expériences de single-cell-RNAseq, l'analyse des résultats, la génération de la base de données LR et de la Shiny App ont été réalisés par Rémi Mathieu. Certaines analyses des données LR ont été faites par Tangra Draia-Nicolau. Le développement de la version finale de l'interface de la Shiny App et sa mise à disposition du Public a été fait par Lucas Silvagnoli. Le design, la production des shRNA, et les analyses sur l'inhibition périsomatique ont été réalisés par Annousha Govindan et Vianney Bensa. La validation des shRNA et les expériences de proximity ligation assays (PLA) ont été réalisés par Emilie Pallesi-Pocachard.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Title: Inferring Ligand-Receptor Interactions between GABAergic and Glutamatergic neurons during somatosensory cortex development

Authors: Rémi Mathieu[1], Léa Corbières[1], Tangra Draia-Nicolau[1], Annousha Govindan[1], Vianney Bensa[1], Emilie Pallesi-Pocachard[1], Alfonso Represa[1], Carlos Cardoso[1], Ludovic Telley[2]*, Antoine de Chevigny[1]*

Affiliations:

[1] INMED, INSERM, Aix Marseille Univ, Marseille, France

[2] Department of Fundamental Neurosciences, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

*Correspondence:

Antoine de Chevigny

antoine.de-chevigny@inserm.fr

Ludovic Telley

ludovic.telley@unil.ch

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Abstract: The cerebral cortex contains a diversity of excitatory and inhibitory neuron types with specific positional and synaptic connectivity patterns, but the molecular mechanisms underlying this stereotypic organization are largely unknown. In search for LR pairs that regulate interactions and connectivity between cortical neurons during embryonic and postnatal development, we tracked transcriptional dynamics of all genes for all cortical neuron types over 17 time points covering the entirety of cortical development. We then constructed a bioinformatic atlas to infer significant LR mediated interactions between all neuron types over cortex development. The atlas proved a strong observation validator and hypothesis generator by uncovering the essential role of two cadherin superfamily members in perisomatic inhibition of deep and superficial layer excitatory neurons by neighboring parvalbumin-expressing basket cells.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Main Text:

The mammalian cerebral cortex is a six-layered tissue located at the brain's surface, responsible for the most complex cognitive functions. To achieve these functions, it must undergo highly orchestrated and conserved developmental processes ultimately leading to the finely organized communication between two primary classes of neurons: excitatory glutamatergic neurons (GlutNs) and inhibitory GABAergic neurons (GABANs). Both GlutNs and GABANs are further divided into various subtypes, a diversity revealed through single-cell RNA sequencing (scRNA-seq). Based on biological significance, researchers have identified eleven main GlutN and sixteen main GABAN subtypes, totaling twenty-seven neuron subtypes [1–4]. These subtypes (1) exhibit specific morphological, electrophysiological, and transcriptomic properties, (2) preferentially localize to certain cortical layers, (3) form and receive synaptic connections from specific neuronal partners, often targeting particular subcellular compartments and (4) play defined roles in cortical computation, which are gradually being understood. The resulting cortical arrangement and associated synaptic connectivity, involving up to 729 potential neuron pairings, are crucial for cortical function. Even a disruption in the communication between just one pair of neuron subtypes at a particular developmental stage might lead to cortical dysfunction and subsequent neurodevelopmental disorders.

Therefore, characterizing how the final positions and synaptic specificities of the 729 potential neuronal *cell-type* pairs are established and regulated throughout development is crucial for both developmental and clinical neuroscience. Over the past decade, a tremendous effort has been made in characterizing the identity, laminar position and synaptic characteristics of cortical neuronal subtypes [3–5]. However, the molecular mechanisms that regulate these processes throughout development remain largely unknown, with only few exceptions [6–8].

It is likely that cell-cell communications via LR interactions play a key role, as these interactions are critical in the development of many tissues and organs. Several studies support this hypothesis, suggesting that excitatory glutamatergic neurons (GlutNs) may non-cell autonomously influence the recruitment of specific GABAergic neuron (GABAN) subtypes. For example, GlutN subtypes settle into their final positions earlier than the synchronically generated GABANs [9], and altering GlutN subtype identities in specific layers during development has been shown to change the allocation and synaptic connectivity of corresponding GABAN subtypes [10–12].

In this study, we utilize both new and previously published scRNA-seq datasets from mice to begin deciphering the molecular code through which GlutN and GABAN subtypes communicate to generate the finely functioning mammalian cortex. First, we track gene expression dynamics across all GlutN and GABAN subtypes throughout corticogenesis. Then, we build an atlas to infer LR interactions between these subtypes. Finally, we validate the utility of our atlas by demonstrating that it confirms known interactions, fills gaps in previous knowledge by identifying receptors in well-characterized cell pair interactions, and discovers new LR pairs within the cadherin family that are crucial for perisomatic inhibition in deep versus superficial cortical layers.

A single neuron transcriptomics atlas covering mouse somatosensory cortex development

First, we performed scRNA-seq and snRNA-seq to interrogate gene expression in neuronal subtypes of the mouse somatosensory cortex at 6 ages from postnatal day (P)0 to juvenile stages (P30), encompassing the laminar positioning of GABAN subtypes and the establishment of their

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

specific synaptic connectivity with GlutN subtypes. Specifically, we interrogated gene expression: at P0 and P2 (main period for radial migration and laminar allocation of GABANs [13,14]), P5 (programmed cell death of deep layers GABANs [15,16]), P8 (end of radial migration of GABANs and programmed cell death of superficial layers GABANs [17]), P16 (GABAN circuit refinement), and P30 (when the cortical network is established). We collected 58 027 high quality cells across these 6 time points (Fig. 1A). We integrated to this dataset previously published scRNA-seq datasets corresponding to earlier (E11.5 to E18.5) and later (P53-P102, adult) developmental stages [3,18–23], with the goal of covering the entirety of somatosensory corticogenesis (Fig. 1A). Notably, we integrated datasets from embryonic ganglionic eminences (GEs) in order to include early transcriptional development of future cortical GABANs [20–23]. In total, our analysis covers 17 time points ranging between E11.5 to adulthood (Fig. 1A).

After stringent quality control and filtering (Fig. S1A-B and Methods), we first aimed to identify all postmitotic neuronal cell types and track their transcriptional dynamics over cortical development, from E11.5 to adulthood (Fig. S1A). For final cell type nomenclature, we chose as reference the current most comprehensive resource of transcriptomic *cell-types* in the somatosensory cortex made by the Allen Institute*, i.e.*, Yao et al. (2021b) [3] (from now on referred to as AllenRef21, see Methods), corresponding to the adult stage (P53-P102). Assigning cellular identities in early age datasets proved difficult with simple methods given that transcriptional signatures of specific *cell-types* evolve drastically during development [18,21]. To overcome this difficulty, we developed a hierarchical pipeline with different steps assigning identities at increasing resolution levels, similar to the method used by the Allen Institute [3].

First, we assigned cell identities at a broad, low resolution level referred to as the *class* level (Glutamatergic, GABAergic, Non-Neuronal, Immature/Migrating, dorsal pallium progenitor and subpallium progenitor) [3]. For *classes* of embryonic and neonatal datasets (E11.5 to P5), we used an in-house Artificial Neural Network (ANN) approach and took as references the datasets of Di Bella et al. [19] (largest published perinatal dataset for somatosensory cortex, see Methods) and Bandler et al. [22] (corresponding to early GE GABANs destined to the cortex, see Methods). For P8 to P30, because cells were transcriptionally more similar to the adult reference, we used the nearest centroïd classifier of the R package scrattch.hicat [3,24], taking directly as reference the adult Allen dataset AllenRef21 [3] (Fig. S1A). To focus our hypothesis that a LR code between GlutNs and GABANs controls a large part of cortical microcircuits establishment, we kept only post-mitotic GlutNs and GABANs cells for downstream analyses (Fig. 1A, B). In total, 182 084 post-mitotic neurons were further analyzed. To analyze biological variation in gene expression and get rid of technical variation due to datasets coming from different labs using different dissociation methods and different library preparation methods (Fig. 1C, Fig. S1C).

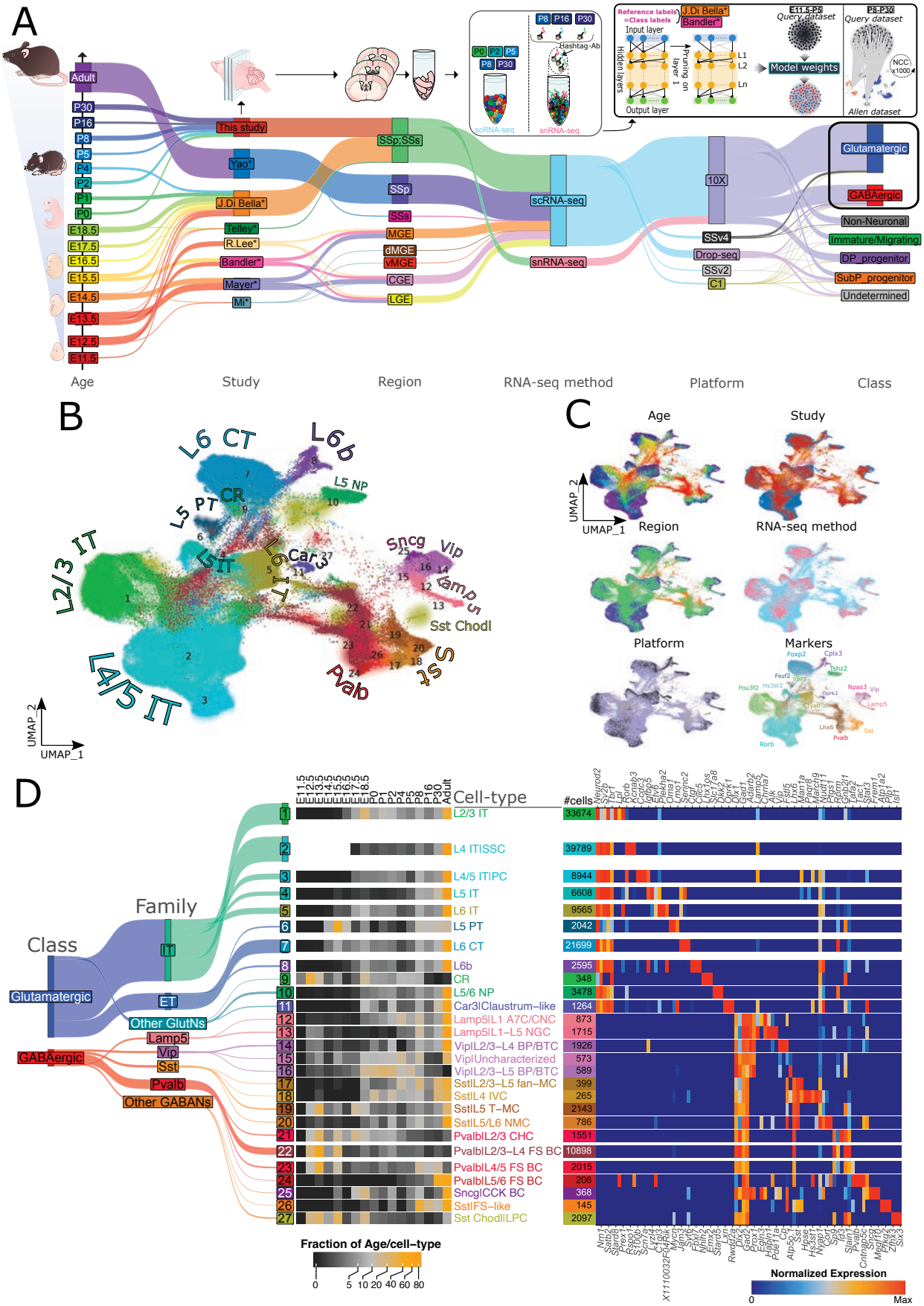
The resulting integrated dataset was split into *classes*, i.e., GlutNs and GABANs. For each *class*, cell identities were further delineated at increasing resolutions; they were determined first at the *subclass* level, and then at the *supertype* level in each subclass, as defined in AllenRef21 [3]. A limitation of the *supertype* level is that it does not correspond to known morpho-functionally identified cortical neuronal subtypes. To identify biologically meaningful *cell-types* in our analysis

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

we leveraged the fact that Yao et al. provided the correspondence between *supertypes* and morpho-electro-connectomic types (*mec-types*) in patch-seq studies [1–3,25] (Fig. S2, S3; Methods). Pooling *supertypes* belonging to the same *mec-type* allowed us to reach a biologically meaningful *cell-type* annotation (Fig. S4). Ultimately, our analysis led to the identification of 159 290 cells, representing 27 *cell-types* (Fig. 1D) including 11 GlutN *cell-types* grouped in 3 *families* - IT, extratelencephalic (ET), Other GlutNs - and 16 GABAN *cell-types* grouped in 5 *families* - Lamp5, Sst, Pvalb, Vip and Other GABANs - (Fig. 1B & 1D, Fig. S4).

In the UMAP embedding of all neurons from 17 ages, each GlutN *cell-type* formed a largely continuous gradient along time of corticogenesis, in which the gene expression of individual cells correlated well with their differentiation status (Fig. 1B, C). Likewise, each GABAN *cell-type* formed a temporal continuum (Fig. 1C, D). Cajal-Retzius (CR) cells were first detected at E11.5, defined by their expression of Trp73 (Fig. 1D).

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.



bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Figure 1. Comprehensive neuronal transcriptomic atlas of mouse somatosensory cortex development. (A) Sankey diagram depicting the experimental paradigm for data collections and integration of published datasets. Yao*: Yao et al., 2021; J. Di Bella*: J. Di Bella et al., 2021, Telley*: Telley et al., 2019; R.Lee*: R.Lee et al., 2022; Bandler: Bandler et al., 2021; Mayer*: Mayer et al., 2018; Mi*: Mi et al., 2018; SSp: primary somatosensory cortex; SSs: supplemental somatosensory cortex; MGE: medial ganglionic eminence; dMGE: dorsal MGE; vMGE: ventral MGE; CGE: caudal ganglionic eminence; LGE: lateral ganglionic eminence; scRNA-seq: single-cell RNA sequencing; snRNA-seq; single-nuclei RNA sequencing; 10X: 10X Genomics; SSv4: Smart-seq version 4; SSv2: Smart-seq version 2; C1: Fluidigm C1. (B) UMAP visualization of post-mitotic neurons from 17 time points after integration. Cells are colored by *cell-type* assignment. (C) UMAP visualization is colored by age, study, region, RNA-seq method, sequencing platform, and gene markers. (D) Left: Sankey plot representing the different hierarchical levels of *cell-type* assignment; middle: heatmap representing the fraction of each cell type per age; right: heatmap representing some cell type-specific genes. "Normalized expression" represents the 25% trimmed mean log2(CPM + 1) expression normalized by row. See also Figs. S1-S4.

Temporal transcriptional dynamics of cortical neuron subtypes

To track the temporal maturation of each transcriptional *cell-type* over migration, programmed cell death, dendritic/axonal development and synaptogenesis in a continuous rather than discrete way, we used an approach in which single cells were ordered on a linear path on the basis of their transcriptional profile [26] (see Methods) (Fig. S5A, Fig. S6A-B). This "pseudo-maturation" axis correlated well with the actual age of the cells (Fig. S5A, Fig. S6A-B), indicating gradual variation in gene expression over neuronal differentiation.

For each *cell-type*, we found genes showing significant variation along the "pseudo-maturation" axis and used them to display temporal gene dynamics in 6 consecutive waves (Fig. S5A, Fig. S6A-B). During early development (E11.5-E18.5), most *cell-types* showed transcriptional signatures related with cell-intrinsic properties (Fig. S5B, Fig. S6C), while later on (neonatal to P30), genetic programs related with cell-cell and cell-environment interactions predominated (Fig. S5B, Fig. S6C) [27,28]. Our data uncover the molecular programs by which each neocortical *cell-type* shifts from intrinsic programs to programs allowing its interaction with other cells during development.

Spatial transcriptional dynamics over corticogenesis

Recent studies have indicated that, in adults, the GlutN IT *family* exhibits a spatial gradient of transcriptional variation along the cortical sheet [29]. We investigated the existence of such spatial transcriptomic gradients for each cell *family* at each age between E18.5 to P30. The correspondence between our datasets and published Patch-seq [1,2] and MERFISH [29] datasets allowed us to infer the average adult laminar position for each *cell-type* (Fig. S2 & S3). Using a

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

similar approach as for pseudo-maturation, for each *family* that displayed spatial organization along the cortical sheet and for each age, we fitted a curve along UMAP continua, and called this axis the "pseudo-layer" score.

First, our analysis uncovered that the spatial transcriptional gradient described for the IT *family* in adults [29] was also found at all earlier ages examined, from E18.5 to P30 (Fig. S7A). Strikingly, we also identified clear spatial transcriptional continua for ET (Fig. S7C), Sst (Fig. S8A), Pvalb (Fig. S8C), Vip (Fig. S9A) and Lamp5 (Fig. S9C) *families*, at all ages examined. For each *family* and at every age, we identified genes with significant variation along pseudo-layers and used them to discretize gene dynamics in 6 spatial transcriptional waves. In GlutNs of neonatal mice (E18.5 to P5), the first waves, which corresponded to upper layer GlutNs (UL), displayed genetic signatures of immaturity such as intrinsic properties (Fig. S7, B and D); this was not the case for late waves, which correspond to deep layers (DL). This result is consistent with UL GlutNs being born later than DL GlutNs - due to cortical inside-out patterning - and therefore maturing later [18]. For GABANs, environment-sensing programs were already at play at E18.5 (Fig. S8, B and D), consistent with the hypothesis that these neurons need signals from previously settled GlutNs to reach their final position and connect the network appropriately [10–12,30].

Spatiotemporal transcriptional landscapes

On the basis of the pseudo-maturation and pseudo-layer scores, cells of each *family* were embedded within 2D graphs, so as to generate spatiotemporal transcriptional landscapes for each gene within every cell *family* (Fig. 2A-D and S10). For any gene queried in a given *family*, the 2D transcriptional map shows temporal dynamics in the x axis and spatial dynamics in the y axis (Fig. 2B-D). This allowed us to confirm the spatiotemporal expression of genes known to be involved in areal patterning (Cux1, Fezf2, Reln, Fig. 2B-C) or in neuropeptidergic system maturation (Fig. 2D).

For validation, we verified whether the transcriptional landscapes of some specific LR pairs implicated in the processes of migration and/or synaptogenesis matched their known function. We took as a first example CXCL12-CXCR4 and CXCL12-ACKR3 that are essential for the tangential migration of GABANs [31,32]. The literature indicates that CXCL12 is expressed during the perinatal period by the meninges [33] and by immature subventricular zone/intermediate zone GlutNs [34]. A recent study also suggests expression in CR cells [35], but this requires confirmation. Concurrently, the CXCL12 co-receptors CXCR4 and ACKR3 are expressed by migrating GABANs [36,37], while CXCR4 is also found in CR cells [4]. The postnatal extinction of CXCL12 expression is thought to prompt the switch of GABANs from tangential migration to cortical plate invasion and lamination (Fig. 2E) [31,32,38]. Our expression atlas confirms these documented spatio-temporal expression patterns, as they are precisely mirrored in our transcriptional landscapes for Cxcl12, Cxcr4, and Ackr3 (Fig. 2E). Notably, the enrichment of Cxcl12 in CR cells was confirmed, and expressions of Cxcl12, Cxcr4, and Ackr3 were restricted to early time points (E18.5-P0), aligning with a role in migration but not in synaptogenesis (Fig. 2E).

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

We then investigated a LR pair associated with synaptogenesis rather than migration. It is well established that the formation of synapses requires specific adhesion molecules, including the NRXN1-NLGN1 LR pair (Fig. 2E) [39,40]. Our landscapes showed Nrxn1 and Nlgn1 expression in all cell types during time windows consistent with synaptogenesis (Fig. 2E), supporting the role of these proteins in this process.

We next conducted a broader analysis of transcriptional landscapes using PCA and k-means clustering, which allowed us to identify 15 archetypal gene expression profiles spanning from early to late developmental stages and from deep to superficial cortical layers (Fig. 2F). This approach uncovered a wide range of spatiotemporal expression profiles, suggesting that certain genes are associated with early developmental processes, such as lamination, while others are linked to later stages, like synaptogenesis. Notably, the Cadherin gene family exhibited members across all 15 clusters (Fig. 2G), indicating a high degree of spatiotemporal diversity within this family.

Developmental gene expression functions have been made available using the gene expression function of a Shiny app that we developed and called *scLRSomatoDev* (weblink to be released), where researchers can visualize the spatiotemporal expression of any gene(s) in any neuronal *cell-type* over cortical development, using different visual representations (Fig. S11).

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

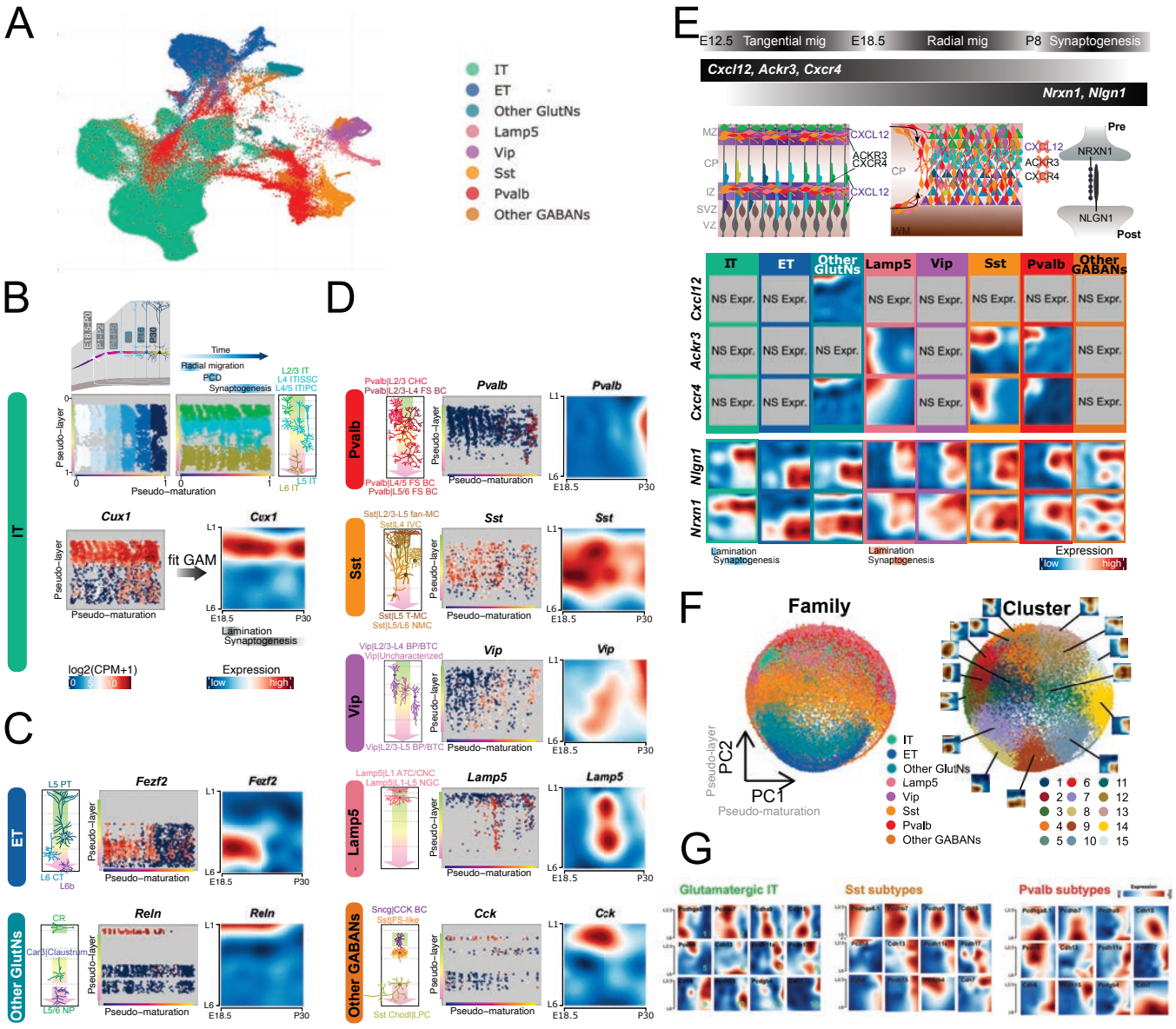


Figure 2. Spatiotemporal transcriptional dynamics for all neuronal cell-types during somatosensory cortex development. (A) UMAP visualization of all neurons color coded with cell family labels. (B) Top: 2D map in which cells are embedded according to their pseudo-maturation (x-axis) and pseudo-layer (y-axis) scores for the IT *family*. Bottom: A generalized additive model (GAM) was applied to generate 2D maps for the spatiotemporal expression of genes (”transcriptional landscape”) throughout somatosensory cortex development; Cux1 expression is represented as an example. (C) Transcriptional landscapes for *Fezf2* in ET (top) and for Reln in other GlutNs (bottom). (D) Transcriptional landscapes for representative genes in each GABAN *family*. (E) Example of transcriptional landscape profiles for genes implicated in GABAN migration (*Cxcl12*, *Ackr3* and *Cxcr4*), and in synaptogenesis (*Nlgn1* and *Nrxn1*). (F) Gene map obtained by performing a PCA on all the significantly expressed genes colored by cell family (left) and by spatiotemporal cluster (right). Average cluster’s transcriptional landscapes are

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

displayed around the gene map. (G) Varying spatiotemporal clusters for the Cadherin gene family among 3 neuronal subtypes. CP, cortical plate ; IZ, intermediate zone ; MZ, marginal zone ; SVZ, subventricular zone ; VZ, ventricular zone ; WM, white matter. See also Figs S5-S11.

An atlas for inference of LR mediated neuronal interactions during cortical development

The underlying hypothesis driving our study posits that interactions mediated by ligand-receptor (LR) pairs between Glutamatergic and GABAergic neurons play a pivotal role in orchestrating the stereotypical construction of the cortex. We thus anticipated observing highly correlated spatiotemporal expression patterns between GlutN ligands and their corresponding GABAN receptors, and vice versa, compared to randomly selected genes within the same *cell-types*. To explore this, we first created a curated ligand-receptor (LR) database by aggregating existing published LR databases and manually adding additional published LR pairs (Fig. 3A & S12, Table S1, see Methods). This LR database, which we called LR_DB, contains 7918 curated LR pairs with 1421 ligands and 1233 receptors. We categorized the ligands and receptors based on molecular functions or neurodevelopmental stages (see Methods).

Interestingly, for LR pairs associated with neurodevelopmental processes in general, such as the cadherin family, the transcriptional landscapes of ligands in IT neurons and of their corresponding receptors in GABAergic neurons were highly correlated (Fig. 3B, Fig. S13-S16). This finding suggests an essential role for these interactions in GlutN-GABAN subtype communication during development and supports recent hypotheses linking cadherins with areal specialization [30,41] and synaptic specificity [42]. LR pairs associated with specific developmental processes, i.e., migration, differentiation, cell death, cell adhesion and synaptogenesis (Table S2 and Methods) displayed varying levels of correlation in their spatiotemporal landscapes (Fig. 3B). Synaptogenesis was the process with the highest LR landscape correlations, suggesting that synaptogenesis relies more than earlier neurogenic processes on cell-cell communications while some processes like cell death or differentiation might depend more on intrinsic mechanisms (Fig. 3B).

To directly identify which ligand-receptor (LR) pairs drive cell-cell interactions and influence cortical development, we constructed a comprehensive LR atlas that infers significant LR interactions between neuronal cell types at various stages from E18.5 to adulthood. The inference of these interactions is based on an integrative approach that combines data from temporal cell-gene expression matrices with information from our LR database (Fig. 3C &S17, see Methods for further details).

To enhance robustness and minimize false positives in our LR predictions, we incorporated weights into each selected *cell-type* pair that reflect known patterns of developmental synchronicity and connectivity. Specifically, a *development* score (Fig. 3C & S17, Table S3) accounted for the varying times at which different cell types populate the cortex, affecting the likelihood of certain interactions depending on the mouse's age (Fig. S18). A *connectivity* score estimated the degree of synaptic connectivity between cell types, based on their physical proximity (Fig. 3C, S17-18; Table S4). These scores were integrated to generate a *cell-type* score, which was

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

applied to each pair to incorporate prior knowledge into the threshold calculation for predicting significant LR-mediated intercellular communications (Fig. 3C and S17, see Methods).

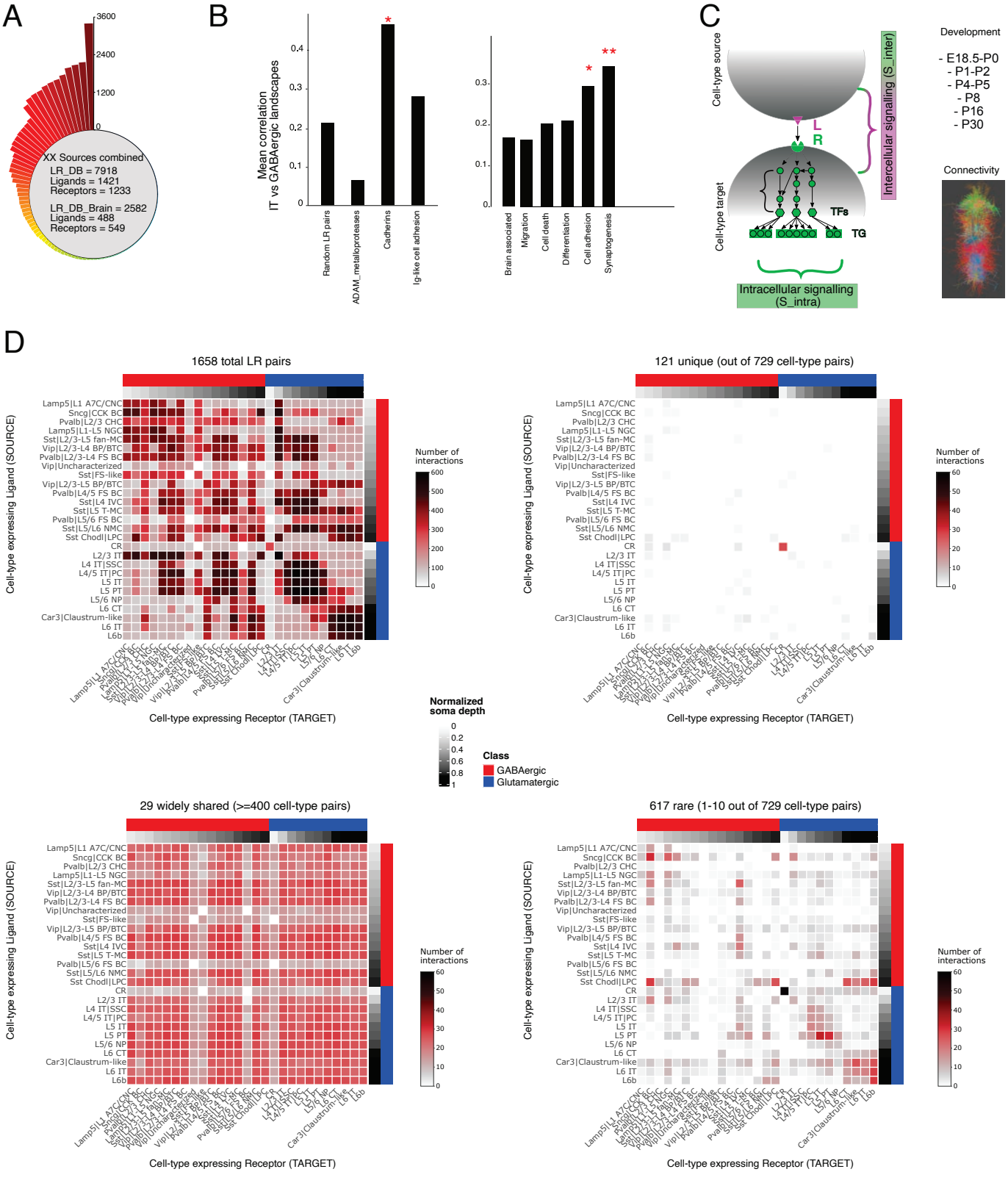
For LR pairs involving secreted ligands, we adjusted the *cell-type* score by assigning a lower weight, acknowledging that these interactions can occur over greater physical distances compared to non-secreted ligands (Fig. S17). To further reduce false positives and ensure robust identification of LR pairs, we retained only those pairs that were significantly present between two contiguous developmental stages (Fig. S17).

The quantification of intracellular signaling downstream of ligand-mediated receptor activation in the target cell type produced an intracellular score (Fig. 3C and S17). This score assesses the reliability of the inferred LR communication and helps identify the preferred receptor(s) utilized when a ligand interacted with multiple receptors.

Predictions of LR interactions over cortex development are accessible via a Shiny app called *scLRSomatoDev* (to-be-published, Fig. S19), allowing researchers to visualize both number and identities of predicted LR interactions between any of the 729 possible neuronal *cell-type* pairs at each of 7 developmental stages covering E18.5-adulthood. Numbers of LR interactions are depicted by heatmaps (Fig. 3D, S19A), while the identities of LR pairs and associated gene ontologies (GO) pathways are represented by dot plots (Fig. S19B).

By which molecular code do specific LR pairs control position and connectivity of *cell-types* ? We performed a general analysis of our LR predictions in order to address this question. For all 729 *cell-type* combinations from E18.5 to adulthood, we analyzed the number of predicted LR pairs, examining the total number, unique pairs, widely shared pairs (shared by over 400 cell pairs), and very rare pairs (shared by fewer than 10 cell pairs) (Fig. 3D). The total number of LR pairs for specific *cell-type* combinations reached as high as ~600, while unique LR pairs were almost non-existent. Widely shared LR pairs were relatively uncommon, with fewer than ~30, whereas very rare LR pairs were more frequent, with up to ~60 identified. These findings suggest that a diverse set of LR pairs, blending both rare and widely shared interactions in specific combinations, underlies the unique cell-cell communication and connectivity patterns observed among different cortical neuron subtypes.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.



bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Figure 3: A LR interactome prediction atlas between GlutNs and GABANs over cortex development.

(A) Curated database of 7918 LR pairs. DB, database; L, ligand; R, receptor. (B) Left, intersections between LR pairs involved in different developmental processes. Right, high correlation of neurodevelopmental process-associated ligand/receptor transcriptional landscapes suggest a LR molecular code for neuronal adhesion and synaptogenesis. (C) Computational method for the inference of LR-mediated interactions. DB, database; L, ligand; TF, transcription factor; TG, target gene; R, receptor; S_inter, score for intercellular communication; S_intra, score for intracellular signaling. See Fig. S18 and Methods. (D) Heatmaps illustrating the number of inferred LR interactions that persist across at least two consecutive ages for all 729 *cell-type* pairs. From left to right and top to bottom: all possible interactions; interactions unique to a single *cell-type* pair, widely shared interactions (by >400 pairs) and very rare interactions (shared by <10 pairs). See also Figs S12-19.

Temporal analysis suggests key roles for LR interactions during synaptogenesis and in neurodevelopmental diseases

We analyzed temporal LR predictions between GlutNs and GABANs. The total number of LRs predicted increased over time (Fig. 4A), which aligns with the gradual establishment of synaptic connectivity. Among GABAN subtypes, Sst and Pvalb neurons were the first to receive a high number of LRs (Fig. 4A), while Lamp5, Vip, and other GABAN populations exhibited a later increase. Notably, Pvalb cells initially had fewer LRs than Sst neurons but gradually caught up, consistent with studies showing that Sst neurons precede Pvalb neurons in the formation of cortical networks [43]. Furthermore, the fact that Sst and Pvalb cells received the most LRs (Fig. 4A) suggests that these subtypes may rely more heavily on non-cell-autonomous signals for their integration into cortical networks than other GABAN subtypes.

We then examined the temporal progression of LR predictions for each *cell-type*, using IT and GABAN subtypes as examples of source and target cells, respectively. Overall, the number of predicted LRs increased over time (Fig. 4B), aligning with the trends observed in the global analysis (Fig. 4A). However, different patterns emerged for UL and DL interactions, i.e., interactions involving UL vs DL GABAN targets (Fig. 4B). In UL interactions, LRs were minimal at early stages but increased progressively, reaching high levels in adulthood. Conversely, DL interactions exhibited relatively high LR numbers early on, with only modest increases as the organism aged. This suggests that the earlier developmental onset of DL neurons enables them to establish LR connections at a younger age compared to UL neurons.

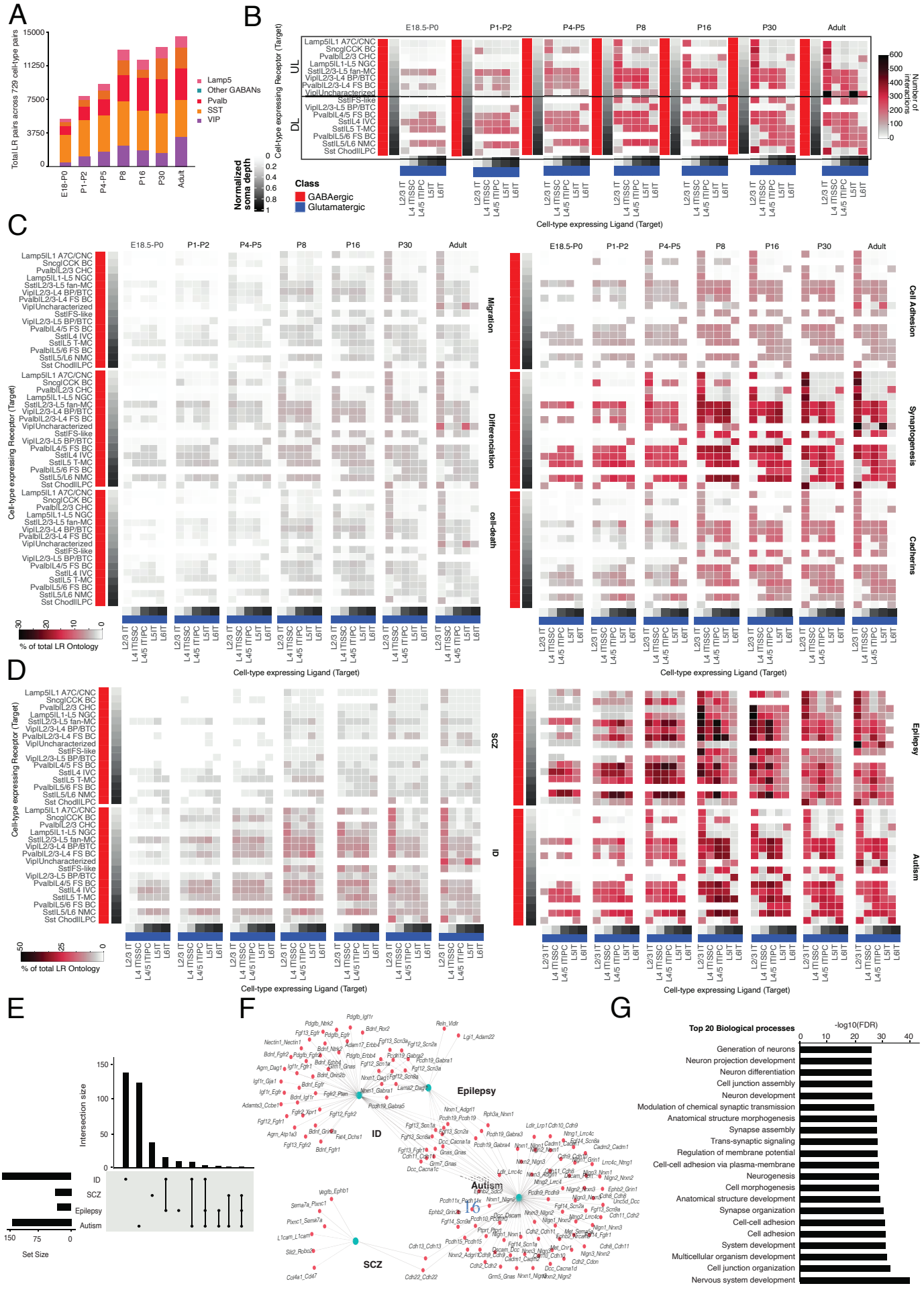
Then, we calculated the percentage of LRs known to intervene in each of the 5 well-known successive neurodevelopmental processes (migration, differentiation, cell death, cell adhesion and synaptogenesis) that was effectively utilized for development. Strikingly, only synaptogenesis-associated LRs, and to a lesser extent cell adhesion-associated LRs, were predicted as strongly utilized across E18.5-adulthood (Fig. 4C). LRs associated with migration, differentiation and cell death were poorly utilized, suggesting that these processes rely less than synaptogenesis on LR-mediated cellular communications and more on cell-intrinsic processes. Notably, Cadherins were

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

quite strongly utilized from P4 onwards, indicating that Cadherins might regulate cell-cell interactions during adhesion and synaptogenesis in the cortex.

We next investigated the timing and involvement of LRs associated with neurodevelopmental diseases during development. Using documented gene-disease associations, we categorized the LRs from the LR_DB into four major neurodevelopmental diseases: autism, epilepsy, schizophrenia (SCZ), and intellectual disability (ID) (Table S5). Notably, the percentage of utilized LRs linked to SCZ and ID remained consistently low across all developmental stages (Fig. 4D). In contrast, LRs associated with autism and epilepsy were utilized at much higher rates, occasionally reaching up to 50%, and their prevalence increased progressively over developmental stages (Fig. 4D). This suggests that the etiology of autism and epilepsy may be more closely related to LR-mediated cell-cell communications compared to SCZ and ID. Additionally, some LRs were associated with multiple diseases (Fig. 4E), and notably, the only two significantly utilized LRs common to both autism and SCZ were the Cadherins, Cdh13 and Cdh22 (Fig. 4F). Consistent with expectations, gene ontology analysis revealed that disease-associated LRs predicted to be utilized during cortical development were enriched in neurodevelopmental biological processes.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.



bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Figure 4: Temporal analysis of LR pairs associated with neurodevelopmental processes and diseases.

(A) Number of LR pairs predicted to be utilized per GABAN family as target cells, from E18 to adulthood. (B) Number of predicted LR interactions between IT and GABAN *cell-type*s as source and target cells, respectively, from E18 to adulthood. (C) Percentage of LR pairs of 5 main neurodevelopmental ontologies and of the cadherin LR family that are predicted as utilized between IT and GABAN *cell-type*s as source and target cells, respectively, from E18 to adulthood. (D) Percentage of LR pairs with both L and R associated with neurodevelopmental diseases that are predicted as utilized between IT and GABAN *cell-type*s as source and target cells, respectively, from E18 to adulthood. (E) Upset plot showing intersections between LR pairs of the 4 diseases studied. (F) Interaction network plot showing the LR pairs associated with each disease. (G) Gene ontologies associated with disease associated LR pairs.

Validation of the LR atlas: Nrg3-Erbb4

We queried our LR atlas to validate known interactions between GlutNs and GABANs, focusing on the Nrg3-Erbb4 pair, which is recognized for mediating the development of excitatory synapses onto GABANs and is linked to neurodevelopmental disorders [44] (Fig. 5A). First, consistent with the literature, transcriptional landscapes confirmed Nrg3 expression in GlutNs and the restriction of Erbb4 expression to GABANs (Fig. 5B). Nrg3 and Erbb4 expression levels peaked in the second half of the developmental timeline, aligning with synaptogenesis (Fig. 5B). Second, our atlas predicts significant Nrg3-Erbb4 interactions from E18.5-P0 to P30 between GlutNs (Nrg3 source) and most GABANs (Erbb4-expressing target cells) (Fig. 5C). Regardless of mouse age, the intracellular signaling score for Nrg3-Erbb4 was strongest in pairs where when target cells were Pvalb BCs and Vip|L2/3−L5 BP/BTCs, two GABAN types known to require Erbb4 signaling for the formation of excitatory synapses [7,8,45]. Overall, our atlas supports the role of the Nrg3-Erbb4 interaction in excitatory synapse formation onto specific GABAN types during corticogenesis.

Utilizing the atlas to enhance understanding of known interactions: the Cbln4 example

We then investigated whether our gene expression and LR atlases could shed new light on known but incompletely understood cell-cell communications. We focused on CBLN4, a ligand that facilitates synapse formation between the axonal termini of Sst neurons and the apical dendrites of GlutNs in the mouse cortex [6,46] (Fig. 5D).

Then, we asked whether our gene expression and LR atlases can bring new information to known but incompletely understood cell-cell communications. We focused on CBLN4, a ligand that mediates the formation of synapses between axonal termini of Sst neurons and apical dendrites of GlutNs in the mouse cortex (Fig. 5D). Despite this knowledge, which precise Sst *cell-type(s)*

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

express(es) Cbln4 and what its receptor(s) is/are in GlutN apical dendrites are two pending questions [46,47] (Fig. 5E) that we addressed using our gene expression and LR atlases. Our analysis of transcriptional profiles revealed that among the 4 identified Sst *cell-types* (Sst|L2/3-L5 fan-MC, Sst|L4 IVC, Sst|L5 T−MC, and Sst|L5/L6 NMCs), only the Sst|L2/3-L5 fan-MCs exhibited strong expression of Cbln4 (Fig. 5F). Then, our LR interactome atlas predicted that Cbln4 was involved in only very few interactions during peak synaptogenesis (P5 to P30), *i.e.*, between Sst|L2/3-L5 fan-MCs as "source" cells and some GlutN types (L2/3 IT, L4 IT|SSC, L4/5 IT|PC, L5 IT and L5 PT) as "target" cells (Fig. 5F) - more unexpectedly, most GABAN *cell-type*s were also predicted as "target" cells. Finally, the LR atlas revealed that among the 3 known Cbln4 receptors (Dcc, Glud1 and Neo1), only Glud1 and Neo1 were predicted to be involved based on intercellular signaling scores (Fig. 5G). These scores exhibited an increase from P4 to P8, which aligns with earlier findings underscoring the significance of Cbln4 during this developmental period [6] and supports its role in synaptic formation.

We then took advantage of the intracellular score to determine whether GLUD1 or NEO1 might predominate as a Cbln4 receptor in the cortex. Interestingly, while a previous study suggested that GLUD1 might be the CBLN4 receptor in cortical GlutNs [46], the intracellular score predicts that NEO1 downstream signaling is much more active than GLUD1 signaling in "target" neurons (Fig. 5G). Neo1-associated genes in "target" GlutNs were notably linked with axon guidance and TGF-beta signaling pathways (Fig. 5G). Based on these predictions, we proceeded to investigate the presence of a direct interaction between CBLN4 and NEO1 or GLUD1 in situ. Utilizing proximity ligation assay (PLA), we identified robust CBLN4-NEO1 interactions in L1-2, whereas interactions between CBLN4 and GLUD1 were either weak or absent (Fig. 5H). Overall, these findings underscore the utility of our gene expression and LR atlases in pinpointing the precise cellular sources of ligands and their primary receptors in target cells.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

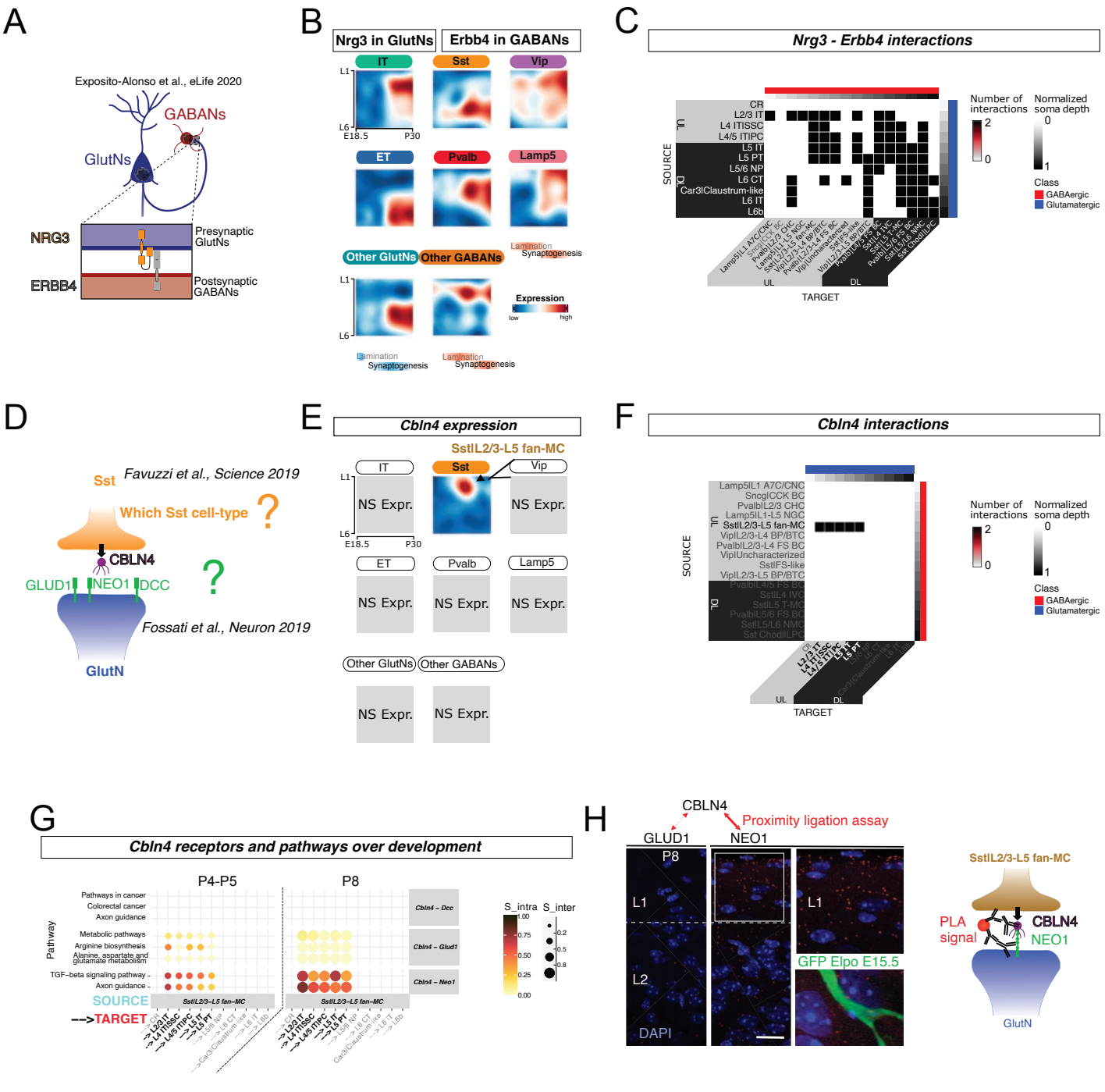


Figure 5. Validation and Application of the Ligand-Receptor Atlas for Knowledge Completion. (A) Diagram illustrating Nrg3-Erbb4 interaction between glutamatergic and GABAergic cells. (B) Nrg3 and Erbb4 expressions in transcriptional landscapes of glutamateric and GABAergic neuron *families*, respectively. (C) Heatmap depicting predictions of Nrg3-Erbb4 mediated cell-cell interactions between GlutN and GABAN *cell-types*. Blue represents GlutN types, red represents GABAN types. The white to black gradient indicates the median normalized soma depth, with 0 at the pial surface and 1 at the white matter. (D) Diagram illustrating Cbln4-

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

mediated inhibitory synapse formation from Sst cells to GlutN in the cortex. (E) Transcriptional landscapes showing Cbln4 expression across different neuronal families. (F) Heatmap of LR pairs involving Cbln4. (G) Dot plot of predicted Clbn4 mediated cell-cell interactions at P4-P5 and P8. Pathways are shown on the left. Cbln4-receptor pairs are represented on the right. (H) Left: Proximity ligation assay (PLA) results for interactions between CBLN4 and NEO1 (left) and CBLN4 and GLUD1 (middle) in cortical layers L1-2; Right: Summary of the experimental findings and predictions resulting from our analysis.

Using our LR atlas to uncover novel interactions: Cdh13 and Pcdh8 as mediators of perisomatic inhibition in deep and superficial layers, respectively

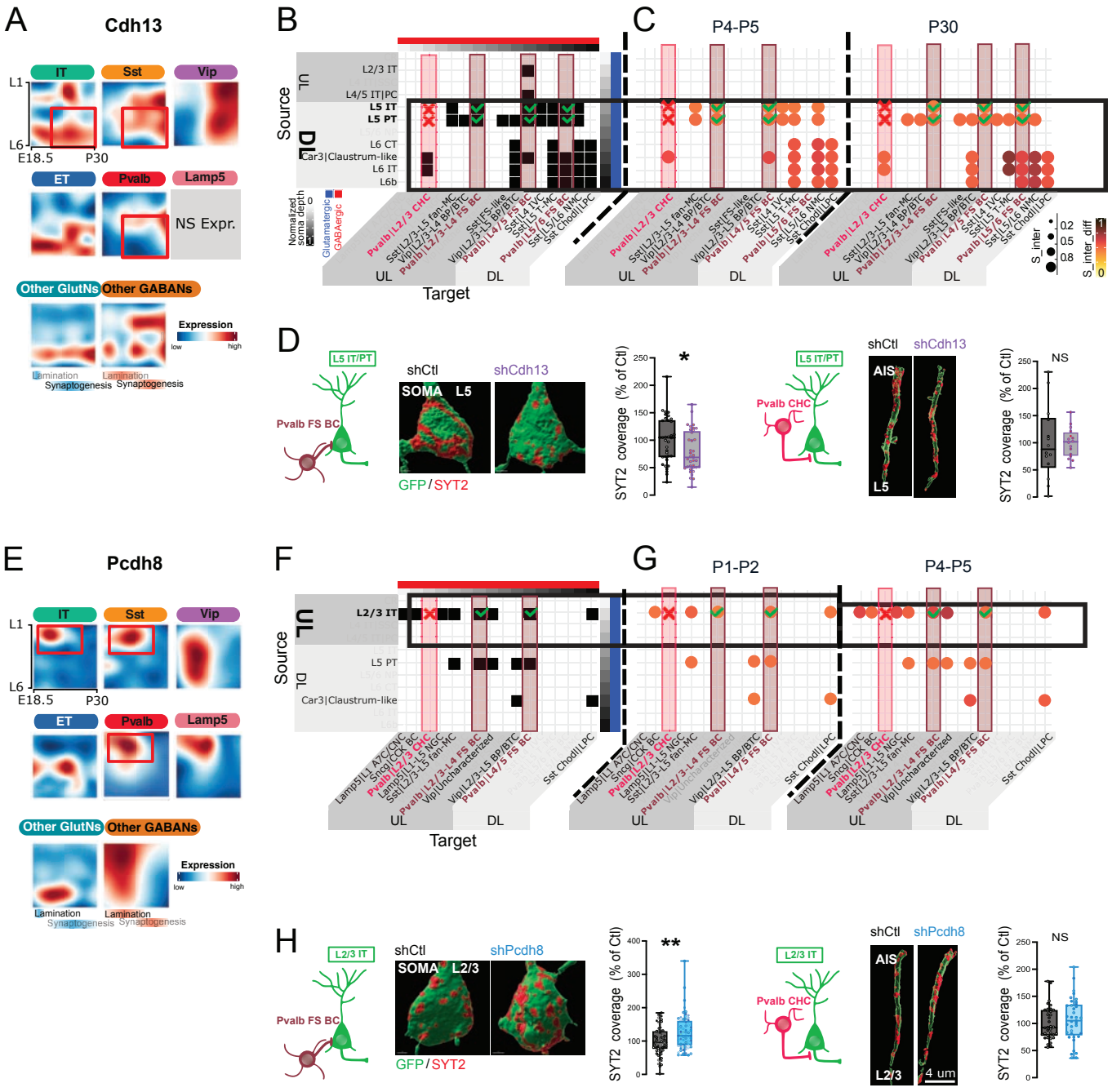
We asked whether our LR atlas can identify novel LR pairs regulating the establishment of specific connectivity patterns. We focused on the cadherin *family* of adhesion molecules that are thought to play such a role in the cortex [41,42,48]. Analysis of transcriptional landscapes revealed notable diversity in the spatio-temporal expression profiles of cadherin family members across different cell types (Fig. 2G).

The atypical Cdh13, associated with neurodevelopmental disorders [49,50], was particularly interesting as it showed highest expression in DL GlutNs and in MGE-derived GABAN *families* (Pvalb & Sst) (Fig. 6A). Cdh13 expression was notably high in DL GlutNs neurons through cortical development, and in Pvalb and Sst neurons around the P4-P30 synaptogenesis period [6] (Fig. 5A). This suggests a role for Cdh13-Cdh13 mediated intercellular communication in the establishment of connectivity between MGE-derived GABANs and DL GlutNs. Accordingly, our LR atlas indeed inferred that Cdh13-Cdh13 mediates interactions that are mainly between Sst / Pvalb GABANs and DL GlutNs. It was a strict rule at specific time points like P4-P5 (peak synaptogenesis) and P30 (Fig. 6C), and there were only exceptions when considering all time points collectively (33/41 involved Pvalb/Sst->DL GlutN pairs, Fig. 6B). These predictions strongly suggest that Cdh13 is a candidate molecule crucial for establishing connectivity between MGE-derived Pvalb and Sst GABANs and DL GlutNs. We used the fact that synaptic connectivity between Pvalb and GlutNs is easily measurable with SYT2 staining [51] to investigate the implication of CDH13 in the development of perisomatic inhibition mediated by Pvalb BCs on DL GlutN somata. After Cdh13 knock-down in L5 GlutNs by in utero electroporation, we assessed SYT2 perisomatic inhibition at P28, after migration and establishment of connectivity have occurred. As expected, the surface area of DL GlutN soma covered by $SYT2^+$ boutons was significantly reduced by Cdh13 knock-down (Fig. 6C) while the mean volume of $SYT2^+$ puncta was unaltered (not shown). This result shows that post-synaptic CDH13 is necessary for proper Pvalb BC-perisomatic inhibition of DL GlutN somata.

We then turned our focus to PCDH8 because its laminar expression is relatively complementary to the one of DL-enriched CDH13, *i.e.*, Pcdh8 is enriched in both GlutNs and Pvalb/Sst GABANs of SL (Fig. 6E). Pcdh8 was also detected in L5 PT and Car3|Claustrum-like GlutNs, albeit to lower levels than L2/3 IT neurons. Our LR atlas predicted 15 GlutN-GABAN interactions with only 3/11

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

"source" *cell-types*, L2/3 IT, L5 PT and Car3|Claustrum-like neurons, and 9/16 "target" *cell-types*, including Pvalb and Sst neurons (Fig. 6F, G). We used in utero electroporation of a Pcdh8 shRNA at E15.5 to investigate the role of PCDH8-PCDH8 interactions in Pvalb-mediated perisomatic inhibition ofL2/3 IT neurons. PCDH8 knock-down significantly increased SYT2 coverage of GFP-electroporated cells compared to a control situation, which indicates that PCDH18 regulates perisomatic inhibition of L2/3 IT neurons, in a negative way (Fig. 6H). Thus, our LR atlas allowed us to conclude that different cadherins modulate perisomatic inhibition in different ways depending on the layer examined.



bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Figure 6. Atlas predictions identifies two cadherins regulating perisomatic inhibition in deep and superficial layers. (A) Cdh13 expression in the different families represented as transcriptional landscapes. (B) Heatmap representing Cdh13-Cdh13 predicted interactions between GlutN SOURCE cell-types and GABAN TARGET cell-types that are common between at least 2 contiguous ages. (C) Cdh13-Cdh13 utilization predictions across GlutNs and GABANs cell-types at P4-P5 and P30. (D) Perisomatic (left) and axon initial segment (AIS, right) inhibitory innervations of E13.5-electroporated L5 GlutNs by SYT2-expressing Pvalb BC and CHC boutons, respectively, when electroporarted GlutNs are control or knocked-down for Cdh13 via shCdh13 (Mann-Whitney test, *p-value < 0.05, n=3-4 mice/condition, > 36 and 14 neurons/condition for soma and AIS, respectively; each animal is represented by a color code). (E) Pcdh8 expression in the different families represented as transcriptional landscapes. (F) Heatmap representing the Pcdh8-Pcdh8 predicted interactions between GlutN SOURCE cell-types and GABAN TARGET cell-types that are common between 2 contiguous ages. (G) Analysis of the homophilic Pcdh8-Pcdh8 pair across P1-P2 and P4-P5. (H) Perisomatic (left) and axon initial segment (AIS, right) inhibitions of E15.5-electroporated L2/3 GlutNs by SYT2-expressing Pvalb BC and CHC boutons, respectively, when electroporarted GlutNs are control or knocked-down for Pcdh8 via shPcdh8 (Mann-Whitney test, **p-value < 0.01, n=3-4 mice/condition,> 61 and 35 neurons/condition, each animal is represented by a color code).

Discussion

Seminal studies in the last decades have indicated that the stereotyped laminar positioning and connectivity of cortical GABAN subtypes are both in large part extrinsically regulated [10–12]. These data suggest that a molecular code based on LR interactions between firstly settled GlutNs and secondarily arriving GABANs might orchestrate cortical circuit assembly. In this work, we utilized high-throughput scRNA-seq to address this question, by attempting to identify LR pairs that are essential for GlutN-GABAN interaction and cortical circuit assembly.

We characterized the transcriptome of all biologically-meaningful neuron types over the course of cortical development, and then focused, for LR interaction assessment, on the E18-P30 critical period during which GABANs reach their preferred laminar position and establish synaptic connections with GlutNs and other GABAN partners. We developed computational tools to: (1) assess spatiotemporal expression of all genes in all cortical neuron types and (2) infer the number and identities of significant LR interactions between all neuron types that might control

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

stereotypical cortical assembly. We provide evidence that these tools can be utilized to: (1) validate true ground observations (e.g., Nrg3 - Erbb4), (2) complete knowledge about known LR interactions (e.g., Cbln4 – Neo1 for Sst MC -> GlutN interaction) and (3) identify novel LR pairs with a role in the formation of specific connections (*e.g.*, the Cdh13 and Pcdh8 cases).

Ligand-receptor mediated cell-cell interactions constitute a fundamental process that is thought to shape most if not all biological tissues. Before the development of scRNA-seq, studying cell-cell interactions was low-throughput, limited to a short selection of genes/proteins and one to few *cell-type* pairs. Since the advent of scRNA-seq, a growing number of computational tools has been developed to infer cell-cell communication. Most tools are based solely on the gene expression level of the LR pair between 2 *cell-types* [52–54], but few tools provide a more accurate reflection of ground truth by considering the response triggered by LR binding in the cell expressing the receptor [55–58]. Here, we benchmarked most of these methods and ended up choosing one of the most recent ones that has the advantage of inferring both intercellular and intracellular signaling for a given LR pair between *cell-type* pairs: scSeqComm [55]. The fact that scSeqComm returns these scores between 0 and 1 makes it easier to increment a threshold to identify relevant LR pairs. For the intercellular score, we determined a threshold using prior knowledge taking into account the final connectivity between *cell-types* (connectivity score) as well as the age (development score) at which the analysis was conducted. This prior knowledge allowed us to increase stringency and robustness of our inferences. Furthermore, by computing an intracellular score, scSeqComm quantifies the evidence of ongoing intracellular signaling triggered by the LR binding in the target cell. This intracellular score allowed us to increase the reliability of inferred communication. Custom thresholds can be set for both intercellular and intracellular scores according to the desired reliability of the inferred interactions. To further increase the reliability of the inferred interactions, we created a meticulously curated LR database by amalgamating existing published databases. Additionally, we incorporated LR pairs from the literature to enrich its content.

Our analysis of the LR atlas reveals that specific neuronal connections are defined by unique combinations of LR pairs for each of the 729 neuronal *cell-type* pairs. Most combinations consist of approximately 40 "pan" LR pairs, shared by over 400 *cell-type* pairs, along with several relatively rare pairs, for example some shared by fewer than 10 *cell-type* pairs. Ligand-receptor pairs unique to a single *cell-type* pair are very rare.

Recent studies have shown that members of the cadherin family of adhesion molecules are differentially expressed in subtypes of cortical excitatory and inhibitory neurons [30,41]. This suggested that a cadherin code may orchestrate the stereotypical organization of cortical circuits. Our findings, which demonstrate that cadherin superfamily members exhibit *cell-type*-pair specific spatiotemporal expression profiles (Fig. S10-S13), and that CDH13 and PCDH8 regulate critical aspects of deep versus superficial circuit formation (Fig. 5), support this hypothesis. Future functional studies based on our LR atlas will be crucial in confirming or refuting this hypothesis.

Based on hypotheses generated by our LR atlas, we experimentally identified two cadherin superfamily members, CDH13 and PCDH8, as regulators of Pvalb BC mediated perisomatic inhibition in DL and SL, respectively. Our observation that Cdh13-Cdh13 interactions are

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

necessary for perisomatic inhibition by Pvalb, but not Sncg, BCs in DL, aligns with a recent study [59].

In contrast to the promotory effect of CDH13 in DL, we find that PCDH8 acts as a suppressor of perisomatic inhibition in SL. Thus, different cadherins or CAM family members might affect synaptogenic processes in opposite ways and in different cortical layers or areas. Nonetheless, given that variations in CDH13 and PCDH8 are associated with neurodevelopmental disorders [49,50,60], we propose that abnormal Pvalb BC-mediated perisomatic inhibition in specific cortical layers might be central to some of these disorders.

In addition to neurons, non-neuronal cells also play a role in the early stages of cortical circuit assembly. For example, blood vessels and ventral oligodendrocyte precursor cells regulate the tangential migration of GABANs from the subpallium to the cortical plate through specific Cxcl12-Sema6a/b-Plxna3 unipolar contact repulsion [61]. Future studies should include single-cell transcriptomics-based analyses of neuron-non-neuronal cell communication to further explore these interactions.

Limitations of the approach – Considerations for Future Improvements in Ligand-Receptor Atlases

Although our approach is robust and comprehensive in terms of the genes investigated for LR interactions, it does not provide information on the subcellular expression of ligands and receptors across different cell types, which is likely important for explaining specific connectivity patterns [44]. Furthermore, our approach focuses on mRNA expression as a proxy for protein expression, although the two may differ in reality. Recent advances in *in vitro* single cell high-throughput proteomics suggest it will soon be possible to include the required subcellular protein expression information in future atlases [61].

Currently, our knowledge of the spatial positions of cortical cell types relative to each other is limited to adult stages [62,4], which impedes precise inference of timely LR mediated cell-cell interactions at specific developmental stages, whether transient or stable. The advent of spatial transcriptomic approaches with exceptional sensitivity, throughput, and resolution holds promise to bridge this gap in the near future.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Acknowledgments:
We thank Julien Prados (UNIGE) for sharing his model Torch necessary to generate the connectivity score, and members of the Cardoso laboratory for their input, and the Molecular and Cellular Biology Facility (PBMC), the Animal Core Facility and the Imaging Facility (inMagic) INMED platforms.

Funding: This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Agence Nationale de la Recherche with ANR-13-JSV4-0006 SynD2 and ANR-23-CE16-0021 CALIN (A.d.C.), NeuroMarseille ICR+ Grant 2021 (A.d.C.), Fondation pour la Recherche sur le Cerveau 'Développement et vieillissement' (A.d.C.), Fondation Lejeune (A.d.C.), European Community 7th Framework programs (Development and Epilepsy—Strategies for Innovative Research to improve diagnosis, prevention and treatment in children with difficult to treat Epilepsy [DESIRE], Health-F2-602531-2013 (A. R., C.C.), and by an Excellence Initiative of Aix–Marseille University/A*MIDEX grant (CALIN-R24002AA) of the French 'Investissements d'Avenir' programme (C.C., A.d.C.). Research in the Telley laboratory was supported by ERC starting grant CERDEV_759112 and a SNSF grant 31003A_182676/1.

Author contributions: A.d.C. and R.M. initiated the study. A.d.C. and L.T. conceptualized and supervised the study. A.d.C., L.T. and R.M. designed and conceptualized the experiments. A.d.C. and R.M. performed most experiments. R.M. analyzed most experiments, supervised by L.T. and A.d.C.. T.D.N. performed some LR analyses for figures 3 and 4. R.M. generated the Shiny app and L.S. added some improvements. C.C., A.G., L.C. and V.B. performed and analyzed shRNA design/production and in utero electroporations. E.P. validated shRNAs and performed proximity ligation assays. A.d.C. and R.M. wrote the manuscript with inputs from all authors.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Data and materials availability: All annotated data will be available online once published. All other data are available in the main text or the supplementary materials. License information: Copyright © 2022 the authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original US government works. https://www.science.org/about/science-licenses-journal-article-reuse

Supplementary Materials

Materials and Methods

Supplementary Text

Figs. S1 to S#

Tables S1 to S5

References:

1. Gouwens, N. W. *et al.* Integrated Morphoelectric and Transcriptomic Classification of Cortical GABAergic Cells. *Cell* **183**, 935-953.e19 (2020).

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

2. Scala, F. *et al.* Phenotypic variation of transcriptomic cell types in mouse motor cortex. *Nature* **598**, 144–150 (2021).
3. Yao, Z. *et al.* A taxonomy of transcriptomic cell types across the isocortex and hippocampal formation. *Cell* **184**, 3222-3241.e26 (2021).
4. Zhang, M. *et al. A Molecularly Defined and Spatially Resolved Cell Atlas of the Whole Mouse Brain*. http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.03.06.531348 (2023) doi:10.1101/2023.03.06.531348.
5. Schneider-Mizell, C. M. *et al.* Cell-type-specific inhibitory circuitry from a connectomic census of mouse visual cortex. Preprint at https://doi.org/10.1101/2023.01.23.525290 (2023).
6. Favuzzi, E. *et al.* Distinct molecular programs regulate synapse specificity in cortical inhibitory circuits. *Science* **363**, 413–417 (2019).
7. Fazzari, P. *et al.* Control of cortical GABA circuitry development by Nrg1 and ErbB4 signalling. *Nature* **464**, 1376–1380 (2010).
8. Bernard, C. *et al.* Cortical wiring by synapse type–specific control of local protein synthesis. *Science* **378**, eabm7466 (2022).
9. Pla, R., Borrell, V., Flames, N. & Marín, O. Layer Acquisition by Cortical GABAergic Interneurons Is Independent of Reelin Signaling. *J. Neurosci.* **26**, 6924–6934 (2006).
10. Lodato, S. *et al.* Excitatory Projection Neuron Subtypes Control the Distribution of Local Inhibitory Interneurons in the Cerebral Cortex. *Neuron* **69**, 763–779 (2011).
11. Ye, Z. *et al.* Instructing Perisomatic Inhibition by Direct Lineage Reprogramming of Neocortical Projection Neurons. *Neuron* **88**, 475–483 (2015).
12. Wester, J. C. *et al.* Neocortical Projection Neurons Instruct Inhibitory Interneuron Circuit Development in a Lineage-Dependent Manner. *Neuron* **102**, 960-975.e6 (2019).
13. Miyoshi, G. & Fishell, G. GABAergic Interneuron Lineages Selectively Sort into Specific Cortical Layers during Early Postnatal Development. *Cereb. Cortex* **21**, 845–852 (2011).
14. Baudoin, J.-P. *et al.* Tangentially Migrating Neurons Assemble a Primary Cilium that Promotes Their Reorientation to the Cortical Plate. *Neuron* **76**, 1108–1122 (2012).
15. Southwell, D. G. *et al.* Intrinsically determined cell death of developing cortical interneurons. *Nature* **491**, 109–113 (2012).
16. Wong, F. K. *et al.* Pyramidal cell regulation of interneuron survival sculpts cortical networks. *Nature* **557**, 668–673 (2018).
17. Priya, R. *et al.* Activity Regulates Cell Death within Cortical Interneurons through a Calcineurin-Dependent Mechanism. *Cell Rep.* **22**, 1695–1709 (2018).
18. Telley, L. *et al.* Temporal patterning of apical progenitors and their daughter neurons in the developing neocortex. *Science* **364**, eaav2522 (2019).
19. Di Bella, D. J. *et al.* Molecular logic of cellular diversification in the mouse cerebral cortex. *Nature* **595**, 554–559 (2021).
20. Mi, D. *et al.* Early emergence of cortical interneuron diversity in the mouse embryo. *Science* **360**, 81–85 (2018).
21. Mayer, C. *et al.* Developmental diversification of cortical inhibitory interneurons. *Nature* **555**, 457–462 (2018).
22. Bandler, R. C. *et al.* Single-cell delineation of lineage and genetic identity in the mouse brain. *Nature* **601**, 404–409 (2022).
23. Lee, D. R. *et al.* Transcriptional heterogeneity of ventricular zone cells in the ganglionic eminences of the mouse forebrain. *eLife* **11**, e71864 (2022).
24. Tasic, B. *et al.* Shared and distinct transcriptomic cell types across neocortical areas. *Nature* **563**, 72–78 (2018).
25. BRAIN Initiative Cell Census Network (BICCN) *et al.* A multimodal cell census and atlas of the mammalian primary motor cortex. *Nature* **598**, 86–102 (2021).
26. Street, K. *et al.* Slingshot: cell lineage and pseudotime inference for single-cell transcriptomics. *BMC Genomics* **19**, 477 (2018).
27. Mandai, K., Rikitake, Y., Mori, M. & Takai, Y. Nectins and Nectin-Like Molecules in Development and Disease. in *Current Topics in Developmental Biology* vol. 112 197–231 (Elsevier, 2015).
28. Friedman, L. G., Benson, D. L. & Huntley, G. W. Cadherin-Based Transsynaptic Networks in Establishing and Modifying Neural Connectivity. in *Current Topics in Developmental Biology* vol. 112 415–465 (Elsevier, 2015).
29. Zhang, M. *et al.* Spatially resolved cell atlas of the mouse primary motor cortex by MERFISH. *Nature* **598**, 137–143 (2021).

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

30. Libé-Philippot, B. *et al.* Auditory cortex interneuron development requires cadherins operating hair-cell mechanoelectrical transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 7765–7774 (2017).
31. Li, G. *et al.* Regional Distribution of Cortical Interneurons and Development of Inhibitory Tone Are Regulated by Cxcl12/Cxcr4 Signaling. *J. Neurosci.* **28**, 1085–1098 (2008).
32. López-Bendito, G. *et al.* Chemokine Signaling Controls Intracortical Migration and Final Distribution of GABAergic Interneurons. *J. Neurosci.* **28**, 1613–1624 (2008).
33. Borrell, V. & Marín, O. Meninges control tangential migration of hem-derived Cajal-Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling. *Nat. Neurosci.* **9**, 1284–1293 (2006).
34. Tiveron, M.-C. *et al.* 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 (2006).
35. Causeret, F., Moreau, M. X., Pierani, A. & Blanquie, O. The multiple facets of Cajal-Retzius neurons. *Development* **148**, dev199409 (2021).
36. Stumm, R. K. *et al.* CXCR4 Regulates Interneuron Migration in the Developing Neocortex. *J. Neurosci.* **23**, 5123–5130 (2003).
37. Wang, Y. *et al.* CXCR4 and CXCR7 Have Distinct Functions in Regulating Interneuron Migration. *Neuron* **69**, 61–76 (2011).
38. Tanaka, D. H. *et al.* CXCR4 Is Required for Proper Regional and Laminar Distribution of Cortical Somatostatin-, Calretinin-, and Neuropeptide Y-Expressing GABAergic Interneurons. *Cereb. Cortex* **20**, 2810–2817 (2010).
39. Graf, E. R., Zhang, X., Jin, S.-X., Linhoff, M. W. & Craig, A. M. Neurexins Induce Differentiation of GABA and Glutamate Postsynaptic Specializations via Neuroligins. *Cell* **119**, 1013–1026 (2004).
40. Krueger, D. D., Tuffy, L. P., Papadopoulos, T. & Brose, N. The role of neurexins and neuroligins in the formation, maturation, and function of vertebrate synapses. *Curr. Opin. Neurobiol.* **22**, 412–422 (2012).
41. Sun, Y.-C. *et al.* Integrating barcoded neuroanatomy with spatial transcriptional profiling enables identification of gene correlates of projections. *Nat. Neurosci.* **24**, 873–885 (2021).
42. Basu, R., Taylor, M. R. & Williams, M. E. The classic cadherins in synaptic specificity. *Cell Adhes. Migr.* **9**, 193–201 (2015).
43. Tuncdemir, S. N. *et al.* Early Somatostatin Interneuron Connectivity Mediates the Maturation of Deep Layer Cortical Circuits. *Neuron* **89**, 521–535 (2016).
44. Exposito-Alonso, D. *et al.* Subcellular sorting of neuregulins controls the assembly of excitatory-inhibitory cortical circuits. *eLife* **9**, e57000 (2020).
45. Batista-Brito, R. *et al.* Developmental Dysfunction of VIP Interneurons Impairs Cortical Circuits. *Neuron* **95**, 884-895.e9 (2017).
46. Fossati, M. *et al.* Trans-Synaptic Signaling through the Glutamate Receptor Delta-1 Mediates Inhibitory Synapse Formation in Cortical Pyramidal Neurons. *Neuron* **104**, 1081-1094.e7 (2019).
47. Liakath-Ali, K., Polepalli, J. S., Lee, S.-J., Cloutier, J.-F. & Südhof, T. C. Transsynaptic cerebellin 4–neogenin 1 signaling mediates LTP in the mouse dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **119**, e2123421119 (2022).
48. Lv, X. *et al.* Patterned cPCDH expression regulates the fine organization of the neocortex. *Nature* **612**, 503–511 (2022).
49. Lesch, K.-P. *et al.* Molecular genetics of adult ADHD: converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies. *J. Neural Transm.* **115**, 1573–1585 (2008).
50. Sanders, S. J. *et al.* Multiple Recurrent De Novo CNVs, Including Duplications of the 7q11.23 Williams Syndrome Region, Are Strongly Associated with Autism. *Neuron* **70**, 863–885 (2011).
51. Sommeijer, J.-P. & Levelt, C. N. Synaptotagmin-2 Is a Reliable Marker for Parvalbumin Positive Inhibitory Boutons in the Mouse Visual Cortex. *PLoS ONE* **7**, e35323 (2012).
52. Efremova, M., Vento-Tormo, M., Teichmann, S. A. & Vento-Tormo, R. CellPhoneDB: inferring cell–cell communication from combined expression of multi-subunit ligand–receptor complexes. *Nat. Protoc.* **15**, 1484–1506 (2020).
53. Cabello-Aguilar, S., Fau, C., Lacroix, M. & Colinge, J. SingleCellSignalR: inference of intercellular networks from single-cell transcriptomics.
54. Hou, R., Denisenko, E., Ong, H. T., Ramilowski, J. A. & Forrest, A. R. R. Predicting cell-to-cell communication networks using NATMI. *Nat. Commun.* **11**, 5011 (2020).
55. Baruzzo, G., Cesaro, G. & Di Camillo, B. Identify, quantify and characterize cellular communication from single-cell RNA sequencing data with *scSeqComm*. *Bioinformatics* **38**, 1920–1929 (2022).
56. Browaeys, R., Saelens, W. & Saeys, Y. NicheNet: modeling intercellular communication by linking ligands to target genes. *Nat. Methods* **17**, 159–162 (2020).

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610245; this version posted September 3, 2024. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

57. Cheng, J., Zhang, J., Wu, Z. & Sun, X. Inferring microenvironmental regulation of gene expression from single-cell RNA sequencing data using scMLnet with an application to COVID-19. *Brief. Bioinform.* **22**, 988–1005 (2021).
58. Hu, Y., Peng, T., Gao, L. & Tan, K. CytoTalk: De novo construction of signal transduction networks using single-cell transcriptomic data. *Sci. Adv.* **7**, eabf1356 (2021).
59. Jézéquel, J. *et al.* Cadherins orchestrate specific patterns of perisomatic inhibition onto distinct pyramidal cell populations. Preprint at https://doi.org/10.1101/2023.09.28.559922 (2023).
60. Butler, M., Rafi, S., Hossain, W., Stephan, D. & Manzardo, A. Whole Exome Sequencing in Females with Autism Implicates Novel and Candidate Genes. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 1312–1335 (2015).
61. Unterauer, E. M. *et al.* Spatial proteomics in neurons at single-protein resolution. *Cell* **187**, 1785-1800.e16 (2024).
62. Yao, Z. *et al. A High-Resolution Transcriptomic and Spatial Atlas of Cell Types in the Whole Mouse Brain*. http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.03.06.531121 (2023) doi:10.1101/2023.03.06.531121.

BIBLIOGRAPHIE

Aaku-Saraste, E., Hellwig, A., & Huttner, W. B. (1996). Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure - Remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. *Developmental Biology*, *180*(2), 664–679. https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0336

Aboitiz, F., Montiel, J., & García, R. R. (2005). Ancestry of the mammalian preplate and its derivatives: Evolutionary relicts or embryonic adaptations? *Reviews in the Neurosciences*, *16*(4), 359–376. https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2005.16.4.359

Abou Jamra, R., Becker, T., Georgi, A., Feulner, T., Schumacher, J., Stromaier, J., Schirmbeck, F., Schulze, T. G., Propping, P., Rietschel, M., Nöthen, M. M., & Cichon, S. (2008). Genetic variation of the FAT gene at 4q35 is associated with bipolar affective disorder. *Molecular Psychiatry*, *13*(3), 277–284. https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002111

Ahmed, A. F., Bock, C. E. De, Lincz, L. F., Pundavela, J., & Zouikr, I. (2015). FAT1 cadherin acts upstream of Hippo signalling through TAZ to regulate neuronal differentiation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(23), 4653–4669. https://doi.org/10.1007/s00018-015-1955-6

Ahmed, A. F., de Bock, C. E., Sontag, E., Hondermarck, H., Lincz, L. F., & Thorne, R. F. (2019). FAT1 cadherin controls neuritogenesis during NTera2 cell differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *514*(3), 625–631. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.197

Akkermans, O., Delloye-Bourgeois, C., Peregrina, C., Carrasquero-Ordaz, M., Kokolaki, M., Berbeira-Santana, M., Chavent, M., Reynaud, F., Raj, R., Agirre, J., Aksu, M., White, E. S., Lowe, E., Ben Amar, D., Zaballa, S., Huo, J., Pakos, I., McCubbin, P. T. N., Comoletti, D., … Seiradake, E. (2022). GPC3-Unc5 receptor complex structure and role in cell migration. *Cell*, *185*(21), 3931-3949.e26. https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.09.025

Alcamo, E. A., Chirivella, L., Dautzenberg, M., Dobreva, G., Fariñas, I., Grosschedl, R., & McConnell, S. K. (2008). Satb2 Regulates Callosal Projection Neuron Identity in the Developing Cerebral Cortex. *Neuron*, *57*(3), 364–377. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.12.012

Alvarez-dolado, M. (2022). *Speci fi c contribution of Reelin expressed by Cajal – Retzius cells or GABAergic interneurons to cortical lamination*. 1–12. https://doi.org/10.1073/pnas.2120079119/-/DCSupplemental.Published

Anastasiadis, P. Z. (2007). p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1773*(1), 34–46. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.040

Ang, E. S. B. C., Haydar, T. F., Gluncic, V., & Rakic, P. (2003). Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. *Journal of Neuroscience*, *23*(13), 5805–5815. https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-13-05805.2003

Anstötz, M., Cosgrove, K. E., Hack, I., Mugnaini, E., Maccaferri, G., & Lübke, J. H. R. (2014). Morphology, input–output relations and synaptic connectivity of Cajal–Retzius cells in layer 1 of the developing neocortex of CXCR4-EGFP mice. *Brain Structure and Function*, *219*(6), 2119–2139. https://doi.org/10.1007/s00429-013-0627-2

Arellano, J. I., Morozov, Y. M., Micali, N., & Rakic, P. (2021). Radial Glial Cells: New Views on Old Questions. *Neurochemical Research*, *46*(10), 2512–2524. https://doi.org/10.1007/s11064-021-03296-z

Arimatsu, Y., Ishida, M., Kaneko, T., Ichinose, S., & Omori, A. (2003). Organization and development of corticocortical associative neurons expressing the orphan nuclear receptor Nurr1. *Journal of Comparative Neurology*, *466*(2), 180–196. https://doi.org/10.1002/cne.10875

Auladell, C., Martinez, A., Alcantara, S., Supèr, H., & Soriano E. (1995). *Migrating neurons in the developing cerebral cortex of the mouse send callosal axons*.

Avilés, E. C., & Goodrich, L. V. (2017). Configuring a robust nervous system with Fat cadherins. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *69*, 91–101. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.06.001

Badouel, C., Zander, M. A., Liscio, N., Bagherie-Lachidan, M., Sopko, R., Coyaud, E., Raught, B., Miller, F. D., & McNeill, H. (2015). Fat1 interacts with Fat4 to regulate neural tube closure, neural progenitor proliferation and apical constriction during mouse brain development. *Development (Cambridge)*, *142*(16), 2781–2791. https://doi.org/10.1242/dev.123539

Baffet, A. D., Hu, D. J., & Vallee, R. B. (2015). Cdk1 Activates Pre-mitotic Nuclear Envelope Dynein Recruitment and Apical Nuclear Migration in Neural Stem Cells. *Developmental Cell*, *33*(6), 703–716. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.04.022

Barber, M., & Pierani, A. (2016). Tangential migration of glutamatergic neurons and cortical patterning during development: Lessons from Cajal-Retzius cells. *Developmental Neurobiology*, *76*(8), 847–881. https://doi.org/10.1002/dneu.22363

Barkovich, A. J., Guerrini, R., Kuzniecky, R. I., Jackson, G. D., & Dobyns, W. B. (2012). A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: Update 2012. *Brain*, *135*(5), 1348–1369. https://doi.org/10.1093/brain/aws019

Battaglia, G., Chiapparini, L., Franceschetti, S., Freri, E., Tassi, L., Bassanini, S., Villani, F., Spreafico, R., D'Incerti, L., & Granata, T. (2006). Periventricular nodular heterotopia: Classification, epileptic history, and genesis of epileptic discharges. *Epilepsia*, *47*(1), 86–97. https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00374.x

Battaglia, G., Granata, T., Farina, L., D'Incerti, L., Franceschetti, S., & Avanzini, G. (1997). Periventricular nodular heterotopia: Epileptogenic findings. *Epilepsia*, *38*(11), 1173–1182. https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1997.tb01213.x

Bear, J. E., Svitkina, T. M., Krause, M., Schafer, D. A., Loureiro, J. J., Strasser, G. A., Maly, I. V., Chaga, O. Y., Cooper, J. A., Borisy, G. G., & Gertler, F. B. (2002). Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell*, *109*(4), 509–521. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00731-6

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. *Journal of Neuroscience*, *25*(24), 5691–5699. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1030-05.2005

Bennett, F. C., & Harvey, K. F. (2006). Fat Cadherin Modulates Organ Size in Drosophila via the Salvador/Warts/Hippo Signaling Pathway. *Current Biology*, *16*(21), 2101–2110. https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.045

Bennett, M. V. L., & Zukin, R. S. (2004). Electrical Coupling and Neuronal Synchronization in the Mammalian Brain. *Neuron*, *41*(4), 495–511. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00043-1

Bertipaglia, C., Gonçalves, J. C., & Vallee, R. B. (2018). Nuclear migration in mammalian brain development. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *82*, 57–66. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.11.033

Bhalla, K., Luo, Y., Buchan, T., Beachem, M. A., Guzauskas, G. F., Ladd, S., Bratcher, S. J., Schroer, R. J., Balsamo, J., DuPont, B. R., Lilien, J., & Srivastava, A. K. (2008). Alterations in CDH15 and KIRREL3 in Patients with Mild to Severe Intellectual Disability. *American Journal of Human Genetics*, *83*(6), 703–713. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.10.020

Bielen, H., & Houart, C. (2014). The Wnt cries many: Wnt regulation of neurogenesis through tissue patterning, proliferation, and asymmetric cell division. *Developmental Neurobiology*, *74*(8), 772–780. https://doi.org/10.1002/dneu.22168

Bielle, F., Griveau, A., Narboux-Nême, N., Vigneau, S., Sigrist, M., Arber, S., Wassef, M., & Pierani, A. (2005). Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nature Neuroscience*, *8*(8), 1002–1012. https://doi.org/10.1038/nn1511

Bizzotto, S., & Francis, F. (2015). Morphological and functional aspects of progenitors perturbed in cortical malformations. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*(FEB), 1–25. https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00030

Bizzotto, S., Uzquiano, A., Dingli, F., Ershov, D., Houllier, A., Arras, G., Richards, M., Loew, D., Minc, N., Croquelois, A., Houdusse, A., & Francis, F. (2017). Eml1 loss impairs apical progenitor spindle length and soma shape in the developing cerebral cortex. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–14. https://doi.org/10.1038/s41598-017-15253-4

Blair, I. P., Chetcuti, A. F., Badenhop, R. F., Scimone, A., Moses, M. J., Adams, L. J., Craddock, N., Green, E., Kirov, G., Owen, M. J., Kwok, J. B. J., Donald, J. A., Mitchell, P. B., & Schofield, P. R. (2006). Positional cloning, association analysis and expression studies provide convergent evidence that the cadherin gene FAT contains a bipolar disorder susceptibility allele. *Molecular Psychiatry*, *11*(4), 372–383. https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001784

Blair, S., & McNeill, H. (2018). Big roles for Fat cadherins. *Current Opinion in Cell Biology*, *51*, 73–80. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.11.006

Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., & Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological Reviews*, *94*(1), 235–263. https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2013

Boggon, T. J., Murray, J., Chappuis-flament, S., Wong, E., Barry, M., Boggon, T. J., Murray, J., & Chappuis-flament, S. (2002). *C-Cadherin Ectodomain Structure and Implications for Cell Adhesion Mechanisms*. *296*(5571), 1308–1313.

Boitard, M., Bocchi, R., Egervari, K., Petrenko, V., Viale, B., Gremaud, S., Zgraggen, E., Salmon, P., & Kiss, J. Z. (2015). Wnt signaling regulates multipolar-to-bipolar transition of migrating neurons in the cerebral cortex. *Cell Reports*, *10*(8), 1349–1361. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.061

Bortone, D., & Polleux, F. (2009). KCC2 Expression Promotes the Termination of Cortical Interneuron Migration in a Voltage-Sensitive Calcium-Dependent Manner. *Neuron*, *62*(1), 53–71. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.01.034

Boulogne, S., Pizzo, F., Chatard, B., Roehri, N., Catenoix, H., Ostrowsky-Coste, K., Giusiano, B., Guenot, M., Carron, R., Bartolomei, F., & Rheims, S. (2022). Functional connectivity and epileptogenicity of nodular heterotopias: A single-pulse stimulation study. *Epilepsia*, *63*(4), 961–973. https://doi.org/10.1111/epi.17168

Bozzi, Y., Provenzano, G., & Casarosa, S. (2018). Neurobiological bases of autism–epilepsy comorbidity: a focus on excitation/inhibition imbalance. *European Journal of Neuroscience*, *47*(6), 534–548. https://doi.org/10.1111/ejn.13595

Brasch, J., Harrison, O. J., Honig, B., & Shapiro, L. (2012). Thinking outside the cell: How cadherins drive adhesion. *Trends in Cell Biology*, *22*(6), 299–310. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.03.004

Brault, J., Bardin, S., Lampic, M., Carpentieri, J. A., Coquand, L., Penisson, M., Lachuer, H., Victoria, G. S., Baloul, S., El Marjou, F., Boncompain, G., Miserey-Lenkei, S., Belvindrah, R., Fraisier, V., Francis, F., Perez, F., Goud, B., & Baffet, A. D. (2022). RAB6 and dynein drive post-Golgi apical transport to prevent neuronal progenitor delamination . *EMBO Reports*, *23*(10), 1–15. https://doi.org/10.15252/embr.202254605

Brault, J.-B., Goud, B., & Baffet, A. (2023). Should I stay or should I go ? L'ancrage des cellules souches neurales au cours du développement du cortex cérébral dépend de la GTPase RAB6 et de la dynéine . *Médecine/Sciences*, *39*(1), 9–12. https://doi.org/10.1051/medsci/2022185

Britanova, O., de Juan Romero, C., Cheung, A., Kwan, K. Y., Schwark, M., Gyorgy, A., Vogel, T., Akopov, S., Mitkovski, M., Agoston, D., Šestan, N., Molnár, Z., & Tarabykin, V. (2008). Satb2 Is a Postmitotic Determinant for Upper-Layer Neuron Specification in the Neocortex. *Neuron*, *57*(3), 378–392. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.12.028

Broix, L., Jagline, H., Ivanova, E. L., Schmucker, S., Drouot, N., Clayton-Smith, J., Pagnamenta, A. T., Metcalfe, K. A., Isidor, B., Louvier, U. W., Poduri, A., Taylor, J. C., Tilly, P., Poirier, K., Saillour, Y., Lebrun, N., Stemmelen, T., Rudolf, G., Muraca, G., … Chelly, J. (2016). Mutations in the HECT domain of NEDD4L lead to AKT-mTOR pathway deregulation and cause periventricular nodular heterotopia. *Nature Genetics*, *48*(11), 1349–1358. https://doi.org/10.1038/ng.3676

Brown, K. N., Chen, S., Han, Z., Lu, C. H., Tan, X., Zhang, X. J., Ding, L., Lopez-Cruz, A., Saur, D., Anderson, S. A., Huang, K., & Shi, S. H. (2011). Clonal production and organization of inhibitory interneurons in the neocortex. *Science*, *334*(6055), 480–486. https://doi.org/10.1126/science.1208884

Bultje, R. S., Castaneda-Castellanos, D. R., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Kriegstein, A. R., & Shi, S. H. (2009). Mammalian Par3 Regulates Progenitor Cell Asymmetric Division via Notch Signaling in the Developing Neocortex. *Neuron*, *63*(2), 189–202. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.07.004

Cai, E., Barba, M. G., & Ge, X. (2024). Hedgehog Signaling in Cortical Development. *Cells*, *13*(1). https://doi.org/10.3390/cells13010021

Calderwood, D. A., Huttenlocher, A., Kiosses, W. B., Rose, D. M., Woodside, D. G., Schwartz, M. A., & Ginsberg, M. H. (2001). Increased filamin binding to β-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nature Cell Biology*, *3*(12), 1060–1068. https://doi.org/10.1038/ncb1201-1060

Callus, B. A., Verhagen, A. M., & Vaux, D. L. (2006). Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. *FEBS Journal*, *273*(18), 4264–4276. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05427.x

Cappello, S., Gray, M. J., Badouel, C., Lange, S., Einsiedler, M., Srour, M., Chitayat, D., Hamdan, F. F., Jenkins, Z. A., Morgan, T., Preitner, N., Uster, T., Thomas, J., Shannon, P., Morrison, V., Di Donato, N., Van Maldergem, L., Neuhann, T., Newbury-Ecob, R., … Robertson, S. P. (2013). Mutations in genes encoding the cadherin receptor-ligand pair DCHS1 and FAT4 disrupt cerebral cortical development. *Nature Genetics*, *45*(11), 1300–1310. https://doi.org/10.1038/ng.2765

Capurro, M. I., Xu, P., Shi, W., Li, F., Jia, A., & Filmus, J. (2008). Glypican-3 Inhibits Hedgehog Signaling during Development by Competing with Patched for Hedgehog Binding. *Developmental Cell*, *14*(5), 700–711. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.03.006

Carabalona, A., Beguin, S., Pallesi-pocachard, E., Buhler, E., Pellegrino, C., Arnaud, K., Hubert, P., Oualha, M., Siffroi, J. P., Khantane, S., Coupry, I., Goizet, C., Gelot, A. B., Represa, A., & Cardoso, C. (2012). A glial origin for periventricular nodular heterotopia caused by impaired expression of Filamin-A. *Human Molecular Genetics*, *21*(5), 1004–1017. https://doi.org/10.1093/hmg/ddr531

Caruso, N., Herberth, B., Bartoli, M., Puppo, F., Dumonceaux, J., Zimmermann, A., Denadai, S., Lebossé, M., Roche, S., Geng, L., Magdinier, F., Attarian, S., Bernard, R., Maina, F., Levy, N., & Helmbacher, F. (2013). Deregulation of the Protocadherin Gene FAT1 Alters Muscle Shapes: Implications for the Pathogenesis of Facioscapulohumeral Dystrophy. *PLoS Genetics*, *9*(6). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003550

Caspi, M., Atlas, R., Kantor, A., Sapir, T., & Reiner, O. (2000). Interaction between LIS1 and doublecortin, two lissencephaly gene products. *Human Molecular Genetics*, *9*(15), 2205–2213. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.hmg.a018911

Causeret, F., Moreau, M. X., Pierani, A., & Blanquie, O. (2021). The multiple facets of Cajal-Retzius neurons. *Development (Cambridge)*, *148*(11). https://doi.org/10.1242/DEV.199409

Cavallin, M., Rujano, M. A., Bednarek, N., Medina-Cano, D., Bernabe Gelot, A., Drunat, S., Maillard, C., Garfa-Traore, M., Bole, C., Nitschké, P., Beneteau, C., Besnard, T., Cogné, B., Eveillard, M., Kuster, A., Poirier, K., Verloes, A., Martinovic, J., Bidat, L., … Bahi-Buisson, N. (2017). WDR81 mutations cause extreme microcephaly and impair mitotic progression in human fibroblasts and Drosophila neural stem cells. *Brain*, *140*(10), 2597–2609. https://doi.org/10.1093/brain/awx218

Chae, J., Kim, M., Goo, J. H., Collier, S., Gubb, D., Charlton, J., Adler, P. N., & Park, W. J. (1999). *The Drosophila tissue polarity gene starry nightencodes a member of the protocadherin family*. *5429*, 5421–5429.

Chan, E. H. Y., Nousiainen, M., Chalamalasetty, R. B., Schäfer, A., Nigg, E. A., & Sillje, H. H. W. (2005). The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene*, *24*(12), 2076–2086. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208445

Chang, M., Nehs, S., Xu, Z., & Kanold, P. O. (2024). Distinct distribution of subplate neuron subtypes between the sensory cortices during the early postnatal period. *Journal of Comparative Neurology*, *532*(2), 1–19. https://doi.org/10.1002/cne.25594

Chen, G., Sima, J., Jin, M., Wang, K. Y., Xue, X. J., Zheng, W., Ding, Y. Q., & Yuan, X. B. (2008). Semaphorin-3A guides radial migration of cortical neurons during development. *Nature Neuroscience*, *11*(1), 36–44. https://doi.org/10.1038/nn2018

Chen, M., Sun, X., Wang, Y., Ling, K., Chen, C., Cai, X., Liang, X., & Liang, Z. (2019). FAT1 inhibits the proliferation and metastasis of cervical cancer cells by binding β-catenin. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *12*(10), 3807–3818. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31933769%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6949748

Chenn, A., & McConnell, S. K. (1995). Cleavage orientation and the asymetric inheritence of Notch1 immunoreactivity in Mammalian Neurogenesis. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, *41*(3–4), 165–178. https://doi.org/10.5109/24142

Chidambaram, S. B., Rathipriya, A. G., Bolla, S. R., Bhat, A., Ray, B., Mahalakshmi, A. M., Manivasagam, T., Thenmozhi, A. J., Essa, M. M., Guillemin, G. J., Chandra, R., & Sakharkar, M. K. (2019). Dendritic spines: Revisiting the physiological role. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *92*(July 2018), 161–193. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.01.005

Chou, F. S., Li, R., & Shan, P. (2018). Molecular components and polarity of radial glial cells during cerebral cortex development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(6), 1027–1041. https://doi.org/10.1007/s00018-017-2680-0

Chou, S. J., & Tole, S. (2019). Lhx2, an evolutionarily conserved, multifunctional regulator of forebrain development. *Brain Research*, *1705*, 1–14. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.02.046

Chowdhury, T. G., Jimenez, J. C., Bomar, J. M., Cruz-Martin, A., Cantle, J. P., & Portera-Cailliau, C. (2010). Fate of Cajal-Retzius neurons in the postnatal mouse neocortex. *Frontiers in Neuroanatomy*, *4*(MARCH), 1–8. https://doi.org/10.3389/neuro.05.010.2010

Ciani, L., Patel, A., Allen, N. D., & ffrench-Constant, C. (2003). Mice Lacking the Giant Protocadherin mFAT1 Exhibit Renal Slit Junction Abnormalities and a Partially Penetrant Cyclopia and Anophthalmia Phenotype. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(10), 3575–3582. https://doi.org/10.1128/mcb.23.10.3575-3582.2003

Clark, H. F., Brentrup, D., Schneitz, K., Bieber, A., Goodman, C., & Noll, M. (1995). Dachsous encodes a member of the cadherin superfamily that controls imaginai disc

morphogenesis in Drosophila. *Genes and Development*, *9*(12), 1530–1542. https://doi.org/10.1101/gad.9.12.1530

Conti, V., Carabalona, A., Pallesi-pocachard, E., Parrini, E., Leventer, R. J., Buhler, E., Mcgillivray, G., Michel, J., Striano, P., Mei, D., Lise, S., Pagnamenta, A. T., Dobyns, W. B., Scheffer, I. E., Robertson, S. P., & Berkovic, S. F. (2013). *Periventricular heterotopia in 6q terminal deletion syndrome : role of the C6orf70 gene*. 3378–3394. https://doi.org/10.1093/brain/awt249

Cooper, J. A. (2014). Molecules and mechanisms that regulate multipolar migration in the intermediate zone. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(November), 1–11. https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00386

Costa, C. I. S., da Silva Montenegro, E. M., Zarrei, M., de Sá Moreira, E., Silva, I. M. W., de Oliveira Scliar, M., Wang, J. Y. T., Zachi, E. C., Branco, E. V., da Costa, S. S., Lourenço, N. C. V., Vianna-Morgante, A. M., Rosenberg, C., Krepischi, A. C. V., Scherer, S. W., & Passos-Bueno, M. R. (2021). Copy number variations in a Brazilian cohort with autism spectrum disorders highlight the contribution of cell adhesion genes. *Clinical Genetics*, *101*(1), 134–141. https://doi.org/10.1111/cge.14072

Cottereau, E., Mortemousque, I., Moizard, M. P., Bürglen, L., Lacombe, D., Gilbert-Dussardier, B., Sigaudy, S., Boute, O., David, A., Faivre, L., Amiel, J., Robertson, R., Viana Ramos, F., Bieth, E., Odent, S., Demeer, B., Mathieu, M., Gaillard, D., Van Maldergem, L., … Toutain, A. (2013). Phenotypic spectrum of simpson-golabi-behmel syndrome in a series of 42 cases with a mutation in GPC3 and review of the literature. *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics*, *163*(2), 92–105. https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31360

Cox, B., Hadjantonakis, A. K., Collins, J. E., & Magee, A. I. (2000). Cloning and expression throughout mouse development of mfat1, a homologue of the Drosophila tumour suppressor gene fat. *Developmental Dynamics*, *217*(3), 233–240. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(200003)217:3<233::AID-DVDY1>3.0.CO;2-O

Cukier, H. N., Dueker, N. D., Slifer, S. H., Lee, J. M., Whitehead, P. L., Lalanne, E., Leyva, N., Konidari, I., Gentry, R. C., Hulme, W. F., Booven, D. Van, Mayo, V., Hofmann, N. K., Schmidt, M. A., Martin, E. R., Haines, J. L., Cuccaro, M. L., Gilbert, J. R., & Pericak-Vance, M. A. (2014). Exome sequencing of extended families with autism reveals genes shared across neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Molecular Autism*, *5*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/2040-2392-5-1

Da Silva, F., & Niehrs, C. (2023). Multimodal Wnt signalling in the mouse neocortex. *Cells and Development*, *174*(April), 203838. https://doi.org/10.1016/j.cdev.2023.203838

Da Silva, F., Zhang, K., Pinson, A., Fatti, E., Wilsch-Bräuninger, M., Herbst, J., Vidal, V., Schedl, A., Huttner, W. B., & Niehrs, C. (2021). Mitotic WNT signalling orchestrates neurogenesis in the developing neocortex. *The EMBO Journal*, *40*(19), 1–23. https://doi.org/10.15252/embj.2021108041

D'Arcangelo, G. (2005). The Reeler Mouse: Anatomy of a Mutant. *International Review of Neurobiology*, *71*(05), 383–417. https://doi.org/10.1016/S0074-7742(05)71016-3

D'Arcangelo, G., Miao, G. G., Chen, S. C., Scares, H. D., Morgan, J. I., & Curran, T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*, *374*(6524), 719–723. https://doi.org/10.1038/374719a0

Desai, A. R., & McConnell, S. K. (2000). *Progressive restriction in fate potential by neural progenitors during cerebral cortical development*. *2872*, 2863–2872.

Desikan, R. S., & Barkovich, A. J. (2016). Malformations of cortical development. *Annals of Neurology*, *80*(6), 797–810. https://doi.org/10.1002/ana.24793

Desvignes, J. P., Bartoli, M., Delague, V., Krahn, M., Miltgen, M., Béroud, C., & Salgado, D. (2018). VarAFT: A variant annotation and filtration system for human next generation sequencing data. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W545–W553. https://doi.org/10.1093/nar/gky471

Dibbens, L. M., Tarpey, P. S., Hynes, K., Bayly, M. A., Scheffer, I. E., Smith, R., Bomar, J., Sutton, E., Vandeleur, L., Shoubridge, C., Edkins, S., Turner, S. J., Stevens, C., O'Meara, S., Tofts, C., Barthorpe, S., Buck, G., Cole, J., Halliday, K., … Gécz, J. (2008). X-linked protocadherin 19 mutations cause female-limited epilepsy and cognitive impairment. *Nature Genetics*, *40*(6), 776–781. https://doi.org/10.1038/ng.149

Dong, Z., Yang, N., Yeo, S. Y., Chitnis, A., & Guo, S. (2012). Intralineage Directional Notch Signaling Regulates Self-Renewal and Differentiation of Asymmetrically Dividing Radial Glia. *Neuron*, *74*(1), 65–78. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.01.031

D.S.M.-5. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders, D.S.M.-5 (5th ed.)* (American Psychiatric Association, Ed.).

Dubeau, F., Tampieri, D., Lee, N., Andermann, E., Carpenter, S., Leblanc, R., Olivier, A., Radtke, R., Villemure, J. G., & Andermann, F. (1995). Periventricular and subcortical nodular heterotopia A study of 33 patients. *Brain*, *118*(5), 1273–1287. https://doi.org/10.1093/brain/118.5.1273

Dubois, J., Benders, M., Cachia, A., Lazeyras, F., Ha-Vinh Leuchter, R., Sizonenko, S. V., Borradori-Tolsa, C., Mangin, J. F., & Hüppi, P. S. (2008). Mapping the early cortical folding process in the preterm newborn brain. *Cerebral Cortex*, *18*(6), 1444–1454. https://doi.org/10.1093/cercor/bhm180

Dudok, J. J., Murtaza, M., Henrique Alves, C., Rashbass, P., & Wijnholds, J. (2016). Crumbs 2 prevents cortical abnormalities in mouse dorsal telencephalon. *Neuroscience Research*, *108*, 12–23. https://doi.org/10.1016/j.neures.2016.01.001

Dunne, J., Hanby, A. M., Poulsom, R., Jones, T. A., Sheer, D., Chin, W. G., Ming Da, S., Zhao, Q., Beverley, P. C. L., & Owen, M. J. (1995). Molecular cloning and tissue expression of FAT, the human homologue of the drosophila fat gene that is located on chromosome 4q34-q35 and encodes a putative adhesion molecule. *Genomics*, *30*(2), 207–223. https://doi.org/10.1006/geno.1995.9884

Elias, L. A. B., Wang, D. D., & Kriegstein, A. R. (2007). Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature*, *448*(7156), 901–907. https://doi.org/10.1038/nature06063

Elorriaga, V., Pierani, A., & Causeret, F. (2023). Cajal-retzius cells: Recent advances in identity and function. *Current Opinion in Neurobiology*, *79*, 102686. https://doi.org/10.1016/j.conb.2023.102686

Epifanova, E., Salina, V., Lajkó, D., Textoris-taube, K., Naumann, T., Bormuth, O., Bormuth, I., Horan, S., Schaub, T., Borisova, E., Ambrozkiewicz, M. C., Tarabykin, V., & Rosário, M. (2021). *Adhesion dynamics in the neocortex determine the start of migration and the post-migratory orientation of neurons*.

Fabretti, F., Tschernoster, N., Erger, F., Hedergott, A., Buescher, A. K., Dafinger, C., Reusch, B., Köntges, V. K., Kohl, S., Bartram, M. P., Weber, L. T., Thiele, H., Altmueller, J., Schermer, B., Beck, B. B., & Habbig, S. (2021). Expanding the Spectrum of FAT1 Nephropathies by Novel Mutations That Affect Hippo Signaling. *Kidney International Reports*, *6*(5), 1368–1378. https://doi.org/10.1016/j.ekir.2021.01.023

Faix, J., & Rottner, K. (2022). Ena/VASP proteins in cell edge protrusion, migration and adhesion. *Journal of Cell Science*, *135*(6). https://doi.org/10.1242/jcs.259226

Falace, A., Buhler, E., Fadda, M., Watrin, F., Lippiello, P., Pallesi-Pocachard, E., Baldelli, P., Benfenati, F., Zara, F., Represa, A., Fassio, A., & Cardoso, C. (2014). TBC1D24 regulates neuronal migration and maturation through modulation of the ARF6-dependent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(6), 2337–2342. https://doi.org/10.1073/pnas.1316294111

Falace, A., Corbieres, L., Palminha, C., Guarnieri, F. C., Schaller, F., Buhler, E., Tuccari di San Carlo, C., Montheil, A., Watrin, F., Manent, J. B., Represa, A., de Chevigny, A., Pallesi-Pocachard, E., & Cardoso, C. (2024). FLNA regulates neuronal maturation by

modulating RAC1-Cofilin activity in the developing cortex. *Neurobiology of Disease*, *198*(July 2023), 106558. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2024.106558
Feldmeyer, D. (2023). Structure and function of neocortical layer 6b. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *17*(September), 1–16. https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1257803
Feng, Y., Chen, M. H., Moskowitz, I. P., Mendonza, A. M., Vidali, L., Nakamura, F., Kwiatkowski, D. J., & Walsh, C. A. (2006). Filamin a (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(52), 19836–19841. https://doi.org/10.1073/pnas.0609628104
Ferent, J., Zaidi, D., & Francis, F. (2020). Extracellular Control of Radial Glia Proliferation and Scaffolding During Cortical Development and Pathology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*(October). https://doi.org/10.3389/fcell.2020.578341
Ferland, R. J., Batiz, L. F., Neal, J., Lian, G., Bundock, E., Lu, J., Hsiao, Y. C., 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. *Human Molecular Genetics*, *18*(3), 497–516. https://doi.org/10.1093/hmg/ddn377
Fernández, V., Llinares-Benadero, C., & Borrell, V. (2016). Cerebral cortex expansion and folding: what have we learned? *The EMBO Journal*, *35*(10), 1021–1044. https://doi.org/10.15252/embj.201593701
Filmus, J. (2022). The function of glypicans in the mammalian embryo. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *322*(4), C694–C698. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00045.2022
Fleming, R. J. (1998). Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *9*(6), 599–607. https://doi.org/10.1006/scdb.1998.0260
Folstein, S. E., & Rosen-sheidley, B. (2001). *Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder*. *2*(December).
Fox, J. W., Lamperti, E. D., Eks, 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*. *21*, 1315–1325.
Franco, S. J., Gil-sanz, C., Martinez-garay, I., Espinosa, A., Harkins-perry, S. R., Ramos, C., Müller, U., Franco, S., Gil-sanz, C., Martinez-garay, I., Espinosa, A., Harkins-perry, S. R., Ramos, C., & Miillert, U. (2012). *Fate-Restricted Neural Progenitors in the Mammalian Cerebral Cortex*. *337*(6095), 746–749.
Franco, S. J., Martinez-Garay, I., Gil-Sanz, C., Harkins-Perry, S. R., & Müller, U. (2011). Reelin Regulates Cadherin Function via Dab1/Rap1 to Control Neuronal Migration and Lamination in the Neocortex. *Neuron*, *69*(3), 482–497. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.01.003
Frantz, G. D., & McConnell, S. K. (1996). Restrictions of late cerebral cortical progenitor cells to an upper-layer fate. *Neuron*, *17*, 55–61.
Franze, K. (2020). Integrating Chemistry and Mechanics: The Forces Driving Axon Growth. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *36*, 61–83. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100818-125157
Frei, J. A., Brandenburg, C. J., Nestor, J. E., Hodzic, D. M., Plachez, C., McNeill, H., Dykxhoorn, D. M., Nestor, M. W., Blatt, G. J., & Lin, Y.-C. (2021). Postnatal expression profiles of atypical cadherin FAT1 suggest its role in autism. *Biology Open*, *10*(6), 1–10. https://doi.org/10.1242/bio.056457
Frei, J. A., Niescier, R. F., Bridi, M. S., Durens, M., Nestor, J. E., Kilander, M. B. C., Yuan, X., Dykxhoorn, D. M., Nestor, M. W., Huang, S., Blatt, G. J., & Lin, Y. C. (2021).

Regulation of neural circuit development by cadherin-11 provides implications for autism. *ENeuro*, *8*(4). https://doi.org/10.1523/ENEURO.0066-21.2021

Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., & Tsukita, S. (1993). Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *Journal of Cell Biology*, *123*(6 PART 2), 1777–1788. https://doi.org/10.1083/jcb.123.6.1777

Gaiano, N., Nye, J. S., & Fishell, G. (2000). Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron*, *26*(2), 395–404. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81172-1

Gao, W., Tang, Z., Zhang, Y. F., Feng, M., Qian, M., Dimitrov, D. S., & Ho, M. (2015). Immunotoxin targeting glypican-3 regresses liver cancer via dual inhibition of Wnt signalling and protein synthesis. *Nature Communications*, *6*, 1–12. https://doi.org/10.1038/ncomms7536

Gärtner, A., Fornasiero, E. F., & Dotti, C. G. (2015). Cadherins as regulataors of neuronal polarity. *Cell Adhesion and Migration*, *9*(3), 175–182. https://doi.org/10.4161/19336918.2014.983808

Gelman, D., Griveau, A., Dehorter, N., Teissier, A., Varela, C., Pla, R., Pierani, A., & Marín, O. (2011). A wide diversity of cortical GABAergic interneurons derives from the embryonic preoptic area. *Journal of Neuroscience*, *31*(46), 16570–16580. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4068-11.2011

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. *Journal of Neuroscience*, *29*(29), 9380–9389. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0604-09.2009

Gerosa, L., Francolini, M., Bassani, S., & Passafaro, M. (2019). The Role of Protocadherin 19 (PCDH19) in Neurodevelopment and in the Pathophysiology of Early Infantile Epileptic Encephalopathy-9 (EIEE9). *Developmental Neurobiology*, *79*(1), 75–84. https://doi.org/10.1002/dneu.22654

Gil-Sanz, C., Franco, S. J., Martinez-Garay, I., Espinosa, A., Harkins-Perry, S., & Müller, U. (2013). Cajal-Retzius cells instruct neuronal migration by coincidence signaling between secreted and contact-dependent guidance cues. *Neuron*, *79*(3), 461–477. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.06.040

Glantschnig, H., Rodan, G. A., & Reszka, A. A. (2002). Mapping of MST1 kinase sites of phosphorylation: Activation and autophosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(45), 42987–42996. https://doi.org/10.1074/jbc.M208538200

Goh, K. L., Cai, L., Cepko, C. L., & Gertler, F. B. (2002). Ena/VASP proteins regulate cortical neuronal positioning. *Current Biology*, *12*(7), 565–569. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00725-X

Goodrich, L. V., & Strutt, D. (2011). Principles of planar polarity in animal development. *Development*, *138*(10), 1877–1892. https://doi.org/10.1242/dev.054080

Götz, M., & Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *6*(10), 777–788. https://doi.org/10.1038/nrm1739

Grant, C. W., Barreto, E. F., Kumar, R., Kaddurah-daouk, R., Skime, M., Mayes, T., Carmody, T., Biernacka, J., Wang, L., Weinshilboum, R., Trivedi, M. H., Bobo, W. V, Croarkin, P. E., & Athreya, A. P. (2022). *Multi-Omics Characterization of Early- and Adult-Onset Major Depressive Disorder*.

Graves, J. D., Gotoh, Y., Draves, K. E., Ambrose, D., Han, D. K. M., Wright, M., Chernoff, J., Clark, E. A., & Krebs, E. G. (1998). Caspase-mediated activation and induction of apoptosis by the mammalian Ste20-like kinase Mst1. *EMBO Journal*, *17*(8), 2224–2234. https://doi.org/10.1093/emboj/17.8.2224

Green, K. J., & Simpson, C. L. (2007). Desmosomes: New perspectives on a classic. *Journal of Investigative Dermatology*, *127*(11), 2499–2515. https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701015

Gregório, S. P., Sallet, P. C., Do, K. A., Lin, E., Gattaz, W. F., & Dias-Neto, E. (2009). Polymorphisms in genes involved in neurodevelopment may be associated with altered brain morphology in schizophrenia: Preliminary evidence. *Psychiatry Research*, *165*(1–2), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.psychres.2007.08.011

Greig, L. C., Woodworth, M. B., Galazo, M. J., Padmanabhan, H., & Macklis, J. D. (2013). Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(11), 755–769. https://doi.org/10.1038/nrn3586

Gross, G. G., Junge, J. A., Mora, R. J., Kwon, H. B., Olson, C. A., Takahashi, T. T., Liman, E. R., Ellis-Davies, G. C. R., McGee, A. W., Sabatini, B. L., Roberts, R. W., & Arnold, D. B. (2013). Recombinant Probes for Visualizing Endogenous Synaptic Proteins in Living Neurons. *Neuron*, *78*(6), 971–985. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.04.017

Grutzendler, J., Kasthuri, N., & Gan, W. B. (2002). Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature*, *420*(6917), 812–816. https://doi.org/10.1038/nature01276

Guarnieri, F. C., Chevigny, A. de, Falace, A., & Cardoso, C. (2018). *Disorders of neurogenesis and cortical development*. *36*(5), 20–23. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40308-8_2

Gul, I. S., Hulpiau, P., Saeys, Y., & van Roy, F. (2017). Evolution and diversity of cadherins and catenins. *Experimental Cell Research*, *358*(1), 3–9. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.001

Guo, C., Eckler, M. J., McKenna, W. L., McKinsey, G. L., Rubenstein, J. L. R., & Chen, B. (2013). Fezf2 expression identifies a multipotent progenitor for neocortical projection neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. *Neuron*, *80*(5), 1167–1174. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.037

Han, D., Byun, S. H., Park, S., Kim, J., Kim, I., Ha, S., Kwon, M., & Yoon, K. (2015). YAP/TAZ enhance mammalian embryonic neural stem cell characteristics in a Tead-dependent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *458*(1), 110–116. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.077

Hao, Y., Chun, A., Cheung, K., Rashidi, B., & Yang, X. (2008). Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(9), 5496–5509. https://doi.org/10.1074/jbc.M709037200

Hausser, M., Spruston, N., & Stuart, G. J. (2000). Diversity and dynamics of dendritic signaling. *Science*, *290*(5492), 739–744. https://doi.org/10.1126/science.290.5492.739

Hawi, Z., Tong, J., Dark, C., Yates, H., Johnson, B., & Bellgrove, M. A. (2018). The role of cadherin genes in five major psychiatric disorders: A literature update. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, *177*(2), 168–180. https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32592

Helmbacher, F. (2018). Tissue-specific activities of the Fat1 cadherin cooperate to control neuromuscular morphogenesis. In *PLoS Biology* (Vol. 16, Issue 5). https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004734

Helmbacher, F. (2022). Astrocyte-intrinsic and -extrinsic Fat1 activities regulate astrocyte development and angiogenesis in the retina. *Development (Cambridge)*, *149*(2). https://doi.org/10.1242/dev.192047

Hernando-Davalillo, C., Martín, A. A. S., Borregan Prats, M., & Ortigoza-Escobar, J. D. (2022). De novo 4q35.2 duplication containing FAT1 is associated with autism spectrum disorder. *Clinical Genetics*, *July*, 4–7. https://doi.org/10.1111/cge.14194

Hevner, R. F. (2019). Intermediate progenitors and Tbr2 in cortical development. *Journal of Anatomy*, *235*(3), 616–625. https://doi.org/10.1111/joa.12939

Hevner, R. F., Neogi, T., Englund, C., Daza, R. A. M., & Fink, A. (2005). Cajal–Retzius cells in the mouse: transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin Robert. *Proceedings*, *141*(June), 90. http://www.mar.dfo-mpo.gc.ca/science/TRAC/trac.html

Hirabayashi, S., Nakagawa, K., Sumita, K., Hidaka, S., Kawai, T., Ikeda, M., Kawata, A., Ohno, K., & Hata, Y. (2008). Threonine 74 of MOB1 is a putative key phosphorylation site by MST2 to form the scaffold to activate nuclear Dbf2-related kinase 1. *Oncogene*, *27*(31), 4281–4292. https://doi.org/10.1038/onc.2008.66

Hiromoto, Y., Azuma, Y., Suzuki, Y., Hoshina, M., Uchiyama, Y., Mitsuhashi, S., Miyatake, S., Mizuguchi, T., Takata, A., Miyake, N., Kato, M., & Matsumoto, N. (2020). Hemizygous FLNA variant in West syndrome without periventricular nodular heterotopia. *Human Genome Variation*, *7*(1). https://doi.org/10.1038/s41439-020-00131-9

Hoshino, N., Kanadomeb, T., Takasugia, T., Itoha, M., Kanekoa, R., Inoued, Y. U., Inoued, T., Hirabayashia, T., Watanabef, M., Matsudab, T., Nagaib, T., Tarusawaa, E., & Yagi, T. (2023). Visualization of trans homophilic interaction of clustered protocadherin in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *120*, 2017. https://doi.org/10.1073/pnas

Hou, R., Liu, L., Anees, S., Hiroyasu, S., & Sibinga, N. E. S. (2006). The Fat1 cadherin integrates vascular smooth muscle cell growth and migration signals. *Journal of Cell Biology*, *173*(3), 417–429. https://doi.org/10.1083/jcb.200508121

Houlihan, S. L., Lanctot, A. A., Guo, Y., & Feng, Y. (2016). Upregulation of neurovascular communication through filamin abrogation promotes ectopic periventricular neurogenesis. *ELife*, *5*(September2016), 1–21. https://doi.org/10.7554/eLife.17823

Hu, D. J. K., Baffet, A. D., Nayak, T., Akhmanova, A., Doye, V., & Vallee, R. B. (2013). XDynein recruitment to nuclear pores activates apical nuclear migration and mitotic entry in brain progenitor cells. *Cell*, *154*(6), 1300. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.024

Hulpiau, P., & van Roy, F. (2009). Molecular evolution of the cadherin superfamily. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *41*(2), 349–369. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.09.027

Hulpiau, P., & Van Roy, F. (2011). New insights into the evolution of metazoan cadherins. *Molecular Biology and Evolution*, *28*(1), 647–657. https://doi.org/10.1093/molbev/msq233

Huttner, W. B., & Brand, M. (1997). Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells. *Current Opinion in Neurobiology*, *7*(1), 29–39. https://doi.org/10.1016/S0959-4388(97)80117-1

Ishiuchi, T., Misaki, K., Yonemura, S., Takeichi, M., & Tanoue, T. (2009). Mammalian Fat and Dachsous cadherins regulate apical membrane organization in the embryonic cerebral cortex. *Journal of Cell Biology*, *185*(6), 959–967. https://doi.org/10.1083/jcb.200811030

Ito, S., & Kawauchi, T. (2024). Roles of N-cadherin in cerebral cortical development: cooperation with membrane trafficking and actin cytoskeletal regulation. *Neural Regeneration Research*, *20*(1), 188–190. https://doi.org/10.4103/nrr.nrr-d-23-02069

Ivanovski, I., Akbaroghli, S., Pollazzon, M., Gelmini, C., Caraffi, S. G., Mansouri, M., Chavoshzadeh, Z., Rosato, S., Polizzi, V., Gargano, G., Alders, M., Garavelli, L., & Hennekam, R. C. (2018). Van Maldergem syndrome and Hennekam syndrome: Further delineation of allelic phenotypes. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, *176*(5), 1166–1174. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38652

Jin, X., Walker, M. A., Felsövályi, K., Vendome, J., Bahna, F., Mannepalli, S., Cosmanescu, F., Ahlsen, G., Honig, B., & Shapiro, L. (2012). Crystal structures of Drosophila N-cadherin ectodomain regions reveal a widely used class of Ca 2+-free interdomain

linkers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(3). https://doi.org/10.1073/pnas.1117538108
Jontes, J. D. (2018). The cadherin superfamily in neural circuit assembly. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(7). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029306
Jossin, Y., & Cooper, J. A. (2011). Reelin, Rap1 and N-cadherin orient the migration of multipolar neurons in the developing neocortex. *Nature Neuroscience*, *14*(6), 697–703. https://doi.org/10.1038/nn.2816
Kadowaki, M., Nakamura, S., Machon, O., Krauss, S., Radice, G. L., & Takeichi, M. (2007). N-cadherin mediates cortical organization in the mouse brain. *Developmental Biology*, *304*(1), 22–33. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.12.014
Kanadome, T., Hoshino, N., Nagai, T., Matsuda, T., & Yagi, T. (2021). Development of FRET-based indicators for visualizing homophilic trans interaction of a clustered protocadherin. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-021-01481-2
Kandel, E. R., SCHWARTZ, J. H., JESSELL, T. M., HUDSPETH, A. J., & SIEGELBAUM, S. A. (2013). *Principles of Neural Sciences, Fifth Editio* (Issue 112).
Kapitein, L. C., & Hoogenraad, C. C. (2015). Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton. *Neuron*, *87*(3), 492–506. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.046
Kasiah, J., & McNeill, H. (2023). Fat and Dachsous cadherins in mammalian development. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 154). Elsevier. https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2023.02.008
Katoh, M. (2012). Function and cancer genomics of FAT family genes (Review). *International Journal of Oncology*, *41*(6), 1913–1918. https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1669
Kawauchi, T. (2015). Cellullar insights into cerebral cortical development: Focusing on the locomotion mode of neuronal migration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*(OCT), 1–9. https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00394
Kawaue, T., Shitamukai, A., Nagasaka, A., Tsunekawa, Y., Shinoda, T., Saito, K., Terada, R., Bilgic, M., Miyata, T., Matsuzaki, F., & Kawaguchi, A. (2019). Lzts1 controls both neuronal delamination and outer radial glial-like cell generation during mammalian cerebral development. *Nature Communications*, *10*, 1–18. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10730-y
Keeler, A. B., Molumby, M. J., & Weiner, J. A. (2015). Protocadherins branch out: Multiple roles in dendrite development. *Cell Adhesion and Migration*, *9*(3), 214–226. https://doi.org/10.1080/19336918.2014.1000069
Kielar, M., Tuy, F. P. D., Bizzotto, S., Lebrand, C., De Juan Romero, C., Poirier, K., Oegema, R., Mancini, G. M., Bahi-Buisson, N., Olaso, R., Le Moing, A. G., Boutourlinsky, K., Boucher, D., Carpentier, W., Berquin, P., Deleuze, J. F., Belvindrah, R., Borrell, V., Welker, E., … Francis, F. (2014). Mutations in Eml1 lead to ectopic progenitors and neuronal heterotopia in mouse and human. *Nature Neuroscience*, *17*(7), 923–933. https://doi.org/10.1038/nn.3729
Kim, H., Sengupta, A., Glogauer, M., & McCulloch, C. A. (2008). Filamin A regulates cell spreading and survival via β1 integrins. *Experimental Cell Research*, *314*(4), 834–846. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.11.022
Kim, S. Y., Yasuda, S., Tanaka, H., Yamagata, K., & Kim, H. (2011). Non-clustered protocadherin. *Cell Adhesion and Migration*, *5*(2), 97–105. https://doi.org/10.4161/cam.5.2.14374
Kimura, H., Usui, T., Tsubouchi, A., & Uemura, T. (2006). Potential dual molecular interaction of the Drosophila 7-pass transmembrane cadherin Flamingo in dendritic morphogenesis. *Journal of Cell Science*, *119*(6), 1118–1129. https://doi.org/10.1242/jcs.02832

Kircher, M., Witten, D. M., Jain, P., O'roak, B. J., Cooper, G. M., & Shendure, J. (2014). A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nature Genetics*, *46*(3), 310–315. https://doi.org/10.1038/ng.2892

Klaus, J., Kanton, S., Kyrousi, C., Ayo-Martin, A. C., Di Giaimo, R., Riesenberg, S., O'Neill, A. C., Camp, J. G., Tocco, C., Santel, M., Rusha, E., Drukker, M., Schroeder, M., Götz, M., Robertson, S. P., Treutlein, B., & Cappello, S. (2019). Altered neuronal migratory trajectories in human cerebral organoids derived from individuals with neuronal heterotopia. *Nature Medicine*, *25*(4), 561–568. https://doi.org/10.1038/s41591-019-0371-0

Klingler, E., Francis, F., Jabaudon, D., & Cappello, S. (2021). Mapping the molecular and cellular complexity of cortical malformations. *Science*, *371*(6527). https://doi.org/10.1126/science.aba4517

Komada, M., Saitsu, H., Kinboshi, M., Miura, T., Shiota, K., & Ishibashi, M. (2008). Hedgehog signaling is involved in development of the neocortex. *Development*, *135*(16), 2717–2727. https://doi.org/10.1242/dev.015891

Kon, E., Cossard, A., & Jossin, Y. (2017). Neuronal polarity in the embryonic mammalian cerebral cortex. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*(June), 1–15. https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00163

Konstantinides, N., Kapuralin, K., Fadil, C., Barboza, L., Satija, R., & Desplan, C. (2018). Phenotypic Convergence: Distinct Transcription Factors Regulate Common Terminal Features. *Cell*, *174*(3), 622-635.e13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.021

Kopsidas, C. A., Lowe, C. C., McDaniel, D. P., Zhou, X., & Feng, Y. (2024). Sustained generation of neurons destined for neocortex with oxidative metabolic upregulation upon filamin abrogation. *IScience*, *27*(7), 110199. https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.110199

Krause, M., Dent, E. W., Bear, J. E., Loureiro, J. J., & Gertler, F. B. (2003). Ena/VASP Proteins: Regulators of the Actin Cytoskeleton and Cell Migration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *19*, 541–564. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.050103.103356

Kurabayashi, N., Tanaka, A., Nguyen, M. D., & Sanada, K. (2018). The LPA-LPA4 axis is required for establishment of bipolar morphology and radial migration of newborn cortical neurons. *Development (Cambridge)*, *145*(17). https://doi.org/10.1242/dev.162529

Kuwahara, A., Hirabayashi, Y., Knoepfler, P. S., Taketo, M. M., Sakai, J., Kodama, T., & Gotoh, Y. (2010). Wnt signaling and its downstream target N-myc regulate basal progenitors in the developing neocortex. *Development*, *137*(7), 1035–1044. https://doi.org/10.1242/dev.046417

Kwan, K. Y., Šestan, N., & Anton, E. S. (2012). Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development*, *139*(9), 1535–1546. https://doi.org/10.1242/dev.069963

Kwiatkowski, A. V., Rubinson, D. A., Dent, E. W., Edward van Veen, J., Leslie, J. D., Zhang, J., Mebane, L. M., Philippar, U., Pinheiro, E. M., Burds, A. A., Bronson, R. T., Mori, S., Fässler, R., & Gertler, F. B. (2007). Ena/VASP Is Required for Neuritogenesis in the Developing Cortex. *Neuron*, *56*(3), 441–455. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.008

Lafuente, E. M., van Puijenbroek, A. A. F. L., Krause, M., Carman, C. V., Freeman, G. J., Berezovskaya, A., Constantine, E., Springer, T. A., Gertler, F. B., & Boussiotis, V. A. (2004). RIAM, an Ena/VASP and profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion. *Developmental Cell*, *7*(4), 585–595. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.07.021

Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2012). Spindle orientation in mammalian cerebral cortical development. *Current Opinion in Neurobiology*, *22*(5), 737–746. https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.04.003

Lanoue, V., & Cooper, H. M. (2019). Branching mechanisms shaping dendrite architecture. *Developmental Biology*, *451*(1), 16–24. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.12.005
Lavado, A., He, Y., Paré, J., Neale, G., Olson, E. N., Giovannini, M., & Cao, X. (2013). Tumor suppressor Nf2 limits expansion of the neural progenitor pool by inhibiting Yap/Taz transcriptional coactivators. *Development (Cambridge)*, *140*(16), 3323–3334. https://doi.org/10.1242/dev.096537
Lavado, A., Park, J. Y., Paré, J., Finkelstein, D., Pan, H., Xu, B., Fan, Y., Kumar, R. P., Neale, G., Kwak, Y. D., McKinnon, P. J., Johnson, R. L., & Cao, X. (2018). The Hippo Pathway Prevents YAP/TAZ-Driven Hypertranscription and Controls Neural Progenitor Number. *Developmental Cell*, *47*(5), 576-591.e8. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.09.021
Lebrand, C., Dent, E. W., Strasser, G. A., Lanier, L. M., Krause, M., Svitkina, T. M., Borisy, G. G., & Gertler, F. B. (2004). Critical role of Ena/VASP proteins for filopodia formation in neurons and in function downstream of netrin-1. *Neuron*, *42*(1), 37–49. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00108-4
Lee, J. H., Kim, T. S., Yang, T. H., Koo, B. K., Oh, S. P., Lee, K. P., Oh, H. J., Lee, S. H., Kong, Y. Y., Kim, J. M., & Lim, D. S. (2008). A crucial role of WW45 in developing epithelial tissues in the mouse. *EMBO Journal*, *27*(8), 1231–1242. https://doi.org/10.1038/emboj.2008.63
Lefebvre, J. L. (2017). Neuronal territory formation by the atypical cadherins and clustered protocadherins. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *69*, 111–121. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.040
Lefebvre, J. L. (2021). Molecular mechanisms that mediate dendrite morphogenesis. In *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 142). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2020.12.008
Lefebvre, J. L., Kostadinov, D., Chen, W. V., Maniatis, T., & Sanes, J. R. (2012). Protocadherins mediate dendritic self-avoidance in the mammalian nervous system. *Nature*, *488*(7412), 517–521. https://doi.org/10.1038/nature11305
Lei, Q.-Y., Zhang, H., Zhao, B., Zha, Z.-Y., Bai, F., Pei, X.-H., Zhao, S., Xiong, Y., & Guan, K.-L. (2008). TAZ Promotes Cell Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition and Is Inhibited by the Hippo Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(7), 2426–2436. https://doi.org/10.1128/mcb.01874-07
Lerman-Sagie, T., & Leibovitz, Z. (2016). Malformations of Cortical Development: From Postnatal to Fetal Imaging. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, *43*(5), 611–618. https://doi.org/10.1017/cjn.2016.271
LF Custo Greig, MB Woodworth, MJ Galazo, H Padmanabhan, J. M. (2013). Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Jama*, *309*(20), 2105–2106. https://doi.org/10.1038/nrn3586.Molecular
Li, Z., Aelst, L. Van, & Cline, H. T. (2000). *Rho GTPases regulate distinct aspects of dendritic arbor growth in Xenopus central neurons in vivo*. *16*, 217–225.
Lickiss, T., Cheung, A. F. P., Hutchinson, C. E., Taylor, J. S. H., & Molnár, Z. (2012). Examining the relationship between early axon growth and transcription factor expression in the developing cerebral cortex. *Journal of Anatomy*, *220*(3), 201–211. https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2011.01466.x
Light, K. J., Miller, A. L., Doughty, C. J., Joyce, P. R., Olds, R. J., & Kennedy, M. A. (2007). FAT and bipolar affective disorder [5]. *Molecular Psychiatry*, *12*(10), 899–900. https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002040
Lin, C. H., Hsieh, M., & Fan, S. S. (2011). The promotion of neurite formation in Neuro2A cells by mouse Mob2 protein. *FEBS Letters*, *585*(3), 523–530. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.01.003
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). B1 Integrin Maintains Integrity of the Embryonic Neocortical Stem Cell Niche. *PLoS Biology*, *7*(8). https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000176

Lu, J., Lian, G., Lenkinski, R., De Grand, A., Vaid, R. R., Bryce, T., Stasenko, M., Boskey, A., Walsh, C., & Sheen, V. (2007). Filamin B mutations cause chondrocyte defects in skeletal development. *Human Molecular Genetics*, *16*(14), 1661–1675. https://doi.org/10.1093/hmg/ddm114

Luhmann, H. J., Kirischuk, S., & Kilb, W. (2018). The superior function of the subplate in early neocortical development. *Frontiers in Neuroanatomy*, *12*(November), 1–14. https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00097

Luo, J., McQueen, P. G., Shi, B., Lee, C. H., & Ting, C. Y. (2016). Wiring dendrites in layers and columns. *Journal of Neurogenetics*, *30*(2), 69–79. https://doi.org/10.3109/01677063.2016.1173038

Lustig, B., & Behrens, J. (2003). The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *129*(4), 199–221. https://doi.org/10.1007/s00432-003-0431-0

Luxardi, G., Galli, A., Forlani, S., Lawson, K., Maina, F., & Dono, R. (2007). Glypicans are differentially expressed during patterning and neurogenesis of early mouse brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *352*(1), 55–60. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.185

Ma, D., Yang, C. hui, McNeill, H., Simon, M. A., & Axelrod, J. D. (2003). Fidelity in planar cell polarity signalling. *Nature*, *421*(6922), 543–547. https://doi.org/10.1038/nature01366

Magee, J. C. (2000). *Dendritic integration of excitatory synaptic input. 1*(December), 3–5.

Mahoney, P. A., Weber, U., Onofrechuk, P., Biessmann, H., Bryant, P. J., & Goodman, C. S. (1991). The fat tumor suppressor gene in Drosophila encodes a novel member of the cadherin gene superfamily. *Cell*, *67*(5), 853–868. https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90359-7

Mao, Y., Mulvaney, J., Zakaria, S., Yu, T., Morgan, K. M., Allen, S., Basson, M. A., Francis-West, P., & Irvine, K. D. (2011). Characterization of a Dchs1 mutant mouse reveals requirements for Dchs1-Fat4 signaling during mammalian development. *Development*, *138*(5), 947–957. https://doi.org/10.1242/dev.057166

Marín, O., & Rubenstein, J. L. R. (2003). Cell migration in the forebrain. *Annual Review of Neuroscience*, *26*(Figure 1), 441–483. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131058

Marín-Padilla, M. (1998). Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends in Neurosciences*, *21*(2), 64–71. https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01164-8

Martin, D., Degese, M. S., Vitale-Cross, L., Iglesias-Bartolome, R., Valera, J. L. C., Wang, Z., Feng, X., Yeerna, H., Vadmal, V., Moroishi, T., Thorne, R. F., Zaida, M., Siegele, B., Cheong, S. C., Molinolo, A. A., Samuels, Y., Tamayo, P., Guan, K. L., Lippman, S. M., … Gutkind, J. S. (2018). Assembly and activation of the Hippo signalome by FAT1 tumor suppressor. *Nature Communications*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-018-04590-1

Martinez-Garay, I. (2020). Molecular Mechanisms of Cadherin Function During Cortical Migration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*(September), 1–8. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.588152

Martinez-Garay, I., Gil-Sanz, C., Franco, S. J., Espinosa, A., Molnár, Z., & Mueller, U. (2016). Cadherin 2/4 signaling via PTP1B and catenins is crucial for nucleokinesis during radial neuronal migration in the neocortex. *Development (Cambridge)*, *143*(12), 2121–2134. https://doi.org/10.1242/dev.132456

Mase, S., Shitamukai, A., Wu, Q., Morimoto, M., Gridley, T., & Matsuzaki, F. (2021). Notch1 and Notch2 collaboratively maintain radial glial cells in mouse neurogenesis. *Neuroscience Research*, *170*, 122–132. https://doi.org/10.1016/j.neures.2020.11.007

Massimo, M., & Long, K. R. (2022). Orchestrating human neocortex development across the scales; from micro to macro. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *130*(September 2021), 24–36. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.09.007

Mathieu, R., Corbieres, L., Draia-Nicolau, T., Govindan, A., Bensa, V., Pallesi-Pocachard, E., Represa, A., Cardoso, C., Telley, L., & Chevigny, A. de. (2024). Inferring Ligand-Receptor Interactions between GABAergic and Glutamatergic neurons during somatosensory cortex development. *BioRxiv*, 2024.09.02.610245. https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.09.02.610245v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.09.02.610245v1.abstract

Matis, M., & Axelrod, J. D. (2013). Regulation of PCP by the fat signaling pathway. *Genes and Development*, *27*(20), 2207–2220. https://doi.org/10.1101/gad.228098.113

Matsumoto, N., Leventer, R. J., Kuc, J. A., Mewborn, S. K., Dudlicek, L. L., Ramocki, M. B., Pilz, D. T., Mills, P. L., Das, S., Ross, M. E., Ledbetter, D. H., & Dobyns, W. B. (2001). Mutation analysis of the DCX gene and genotype/phenotype correlation in subcortical band heterotopia. *European Journal of Human Genetics*, *9*(1), 5–12. https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200548

Matsunaga, Y., Noda, M., Murakawa, H., Hayashi, K., Nagasaka, A., Inoue, S., Miyata, T., Miura, T., Kubo, K. I., & Nakajima, K. (2017). Reelin transiently promotes N-cadherin-dependent neuronal adhesion during mouse cortical development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(8), 2048–2053. https://doi.org/10.1073/pnas.1615215114

Matteo, F. Di, Bonrath, R., Schmidt, H., Martin, A. C. A., Pravata, V., Giaimo, R. Di, Menegaz, D., Riesenberg, S., Vrij, F. M. S. de, Maccarrone, G., Holzapfel, M., Straub, T., Kushner, S. A., Robertson, S. P., Eder, M., & Cappello, S. (2024). Neuronal Hyperactivity in Neurons Derived from Individuals with Grey Matter Heterotopia. *BioRxiv*, 2024.07.10.602948. https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.07.10.602948v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.07.10.602948v1.abstract

Matus, A. (2005). Growth of dendritic spines: A continuing story. *Current Opinion in Neurobiology*, *15*(1), 67–72. https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.01.015

McKenna, W. L., Ortiz-Londono, C. F., Mathew, T. K., Hoang, K., Katzman, S., & Chen, B. (2015). Mutual regulation between Satb2 and Fezf2 promotes subcerebral projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(37), 11702–11707. https://doi.org/10.1073/pnas.1504144112

Medina, E., Easa, Y., Lester, D. K., Lau, E. K., Sprinzak, D., & Luca, V. C. (2023). Structure of the planar cell polarity cadherins Fat4 and Dachsous1. *Nature Communications*, *14*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41467-023-36435-x

Meng, P., Zhang, Y. F., Zhang, W., Chen, X., Xu, T., Hu, S., Liang, X., Feng, M., Yang, X., & Ho, M. (2021). Identification of the atypical cadherin FAT1 as a novel glypican-3 interacting protein in liver cancer cells. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-020-79524-3

Meng, Z., Moroishi, T., & Guan, K. L. (2016). Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes and Development*, *30*(1), 1–17. https://doi.org/10.1101/gad.274027.115

Meyer, G., Socorro, A. C., Garcia, C. G. P., Millan, L. M., Walker, N., & Caput, D. (2004). Developmental roles of p73 in cajal-retzius cells and cortical patterning. *Journal of Neuroscience*, *24*(44), 9878–9887. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3060-04.2004

Meyerink, B. L., Tiwari, N. K., & Pilaz, L. J. (2020). Ariadne's Thread in the Developing Cerebral Cortex: Mechanisms Enabling the Guiding Role of the Radial Glia Basal Process during Neuron Migration. *Cells*, *10*(1). https://doi.org/10.3390/cells10010003

Misson, J. P., Edwards, M. A., Yamamoto, M., & Caviness, V. S. (1988). Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker. *Developmental Brain Research*, *44*(1), 95–108. https://doi.org/10.1016/0165-3806(88)90121-6

Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H., & Ogawa, M. (2001). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron*, *31*(5), 727–741. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00420-2

Miyoshi, G., & Fishell, G. (2012). Dynamic FoxG1 Expression Coordinates the Integration of Multipolar Pyramidal Neuron Precursors into the Cortical Plate. *Neuron*, *74*(6), 1045–1058. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.025

Moeller, M. J., Soofi, A., Braun, G. S., Li, X., Watzl, G., Kriz, W., & Holzman, L. B. (2004). Protocadherin FAT1 binds Ena/VASP proteins and is necessary for actin dynamics and cell polarization. *EMBO Journal*, *23*(19), 3769–3779. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600380

Molnár, Z., Clowry, G. J., Šestan, N., Alzu'bi, A., Bakken, T., Hevner, R. F., Hüppi, P. S., Kostović, I., Rakic, P., Anton, E. S., Edwards, D., Garcez, P., Hoerder-Suabedissen, A., & Kriegstein, A. (2019). New insights into the development of the human cerebral cortex. *Journal of Anatomy*, *235*(3), 432–451. https://doi.org/10.1111/joa.13055

Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R. L., & Macklis, J. D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*(6), 427–437. https://doi.org/10.1038/nrn2151

Montiel, J. F., Wang, W. Z., Oeschger, F. M., Hoerder-Suabedissen, A., Tung, W. L., García-Moreno, F., Holm, I. E., Villalón, A., & Molnár, Z. (2011). Hypothesis on the dual origin of the mammalian subplate. *Frontiers in Neuroanatomy*, *5*(APRIL), 1–10. https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00025

Moreno, N., González, A., & Rétaux, S. (2009). Development and evolution of the subpallium. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *20*(6), 735–743. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.04.007

Morris, L. G. T., Kaufman, A. M., Gong, Y., Ramaswami, D., Walsh, L. A., Turcan, Ş., Eng, S., Kannan, K., Zou, Y., Peng, L., Banuchi, V. E., Paty, P., Zeng, Z., Vakiani, E., Solit, D., Singh, B., Ganly, I., Liau, L., Cloughesy, T. C., … Chan, T. A. (2013). Recurrent somatic mutation of FAT1 in multiple human cancers leads to aberrant Wnt activation. *Nature Genetics*, *45*(3), 253–261. https://doi.org/10.1038/ng.2538

Morrow, E. M., Yoo, S.-Y., Flavell, S. W., Kim, T.-K., Lin, Y., Hill, R. S., Mukaddes, N. M., Balkhy, S., Gascon, G., Hashmi, A., Al-Saad, S., Ware, J., Joseph, R. M., Greenblatt, R., Gleason, D., Ertelt, J. A., Apse, K. A., Bodell, A., Partlow, J. N., … Walsh, C. A. (2008). Identifying Autism Loci and Genes by Tracing Recent Shared Ancestry. *Science*, *Vol. 321*(No. 5886).

Nadarajah, B., Brunstrom, J. E., Grutzendler, J., Wong, R. O. L., & Pearlman, A. L. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nature Neuroscience*, *4*(2), 143–150. https://doi.org/10.1038/83967

Nagafuchi, A., Takeichi, M., & Tsukita, S. (1991). The 102 kd cadherin-associated protein: Similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. *Cell*, *65*(5), 849–857. https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90392-C

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. *Journal of Neuroscience*, *24*(43), 9648–9657. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2363-04.2004

Nakamura, F., Heikkinen, O., Pentikäinen, O. T., Osborn, T. M., Kasza, K. E., Weitz, D. A., Kupiainen, O., Permi, P., Kilpeläinen, I., Ylännce, J., Hartwig, J. H., & Stossel, T. P. (2009). Molecular basis of filamin A-FilGAP interaction and its impairment in congenital disorders associated with Filamin A mutations. *PLoS ONE*, *4*(3). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004928

Nakamura, F., Osborn, T. M., Hartemink, C. A., Hartwig, J. H., & Stossel, T. P. (2007). Structural basis of filamin A functions. *Journal of Cell Biology*, *179*(5), 1011–1025. https://doi.org/10.1083/jcb.200707073

Nakayama, A. Y., Harms, M. B., & Luo, L. (2000). Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience*, *20*(14), 5329–5338. https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-14-05329.2000

Nestor, M. W., & Hoffman, D. A. (2012). Aberrant dendritic excitability: A common pathophysiology in CNS disorders affecting memory? *Molecular Neurobiology*, *45*(3), 478–487. https://doi.org/10.1007/s12035-012-8265-x

Newey, S. E., Velamoor, V., Govek, E. E., & Van Aelst, L. (2005). Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation. *Journal of Neurobiology*, *64*(1), 58–74. https://doi.org/10.1002/neu.20153

Nian, F. S., & Hou, P. S. (2022). Evolving Roles of Notch Signaling in Cortical Development. *Frontiers in Neuroscience*, *16*(March), 1–15. https://doi.org/10.3389/fnins.2022.844410

Nikolopoulou, E., Galea, G. L., Rolo, A., Greene, N. D. E., & Copp, A. J. (2017). Neural tube closure: Cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Development (Cambridge)*, *144*(4), 552–566. https://doi.org/10.1242/dev.145904

Noctor, S. C., Martinez-Cerdeño, V., Ivic, L., & Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature Neuroscience*, *7*(2), 136–144. https://doi.org/10.1038/nn1172

Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., & Kriegstein, A. R. (2008). Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *Journal of Comparative Neurology*, *508*(1), 28–44. https://doi.org/10.1002/cne.21669

Nollet, F., Kools, P., & Van Roy, F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *Journal of Molecular Biology*, *299*(3), 551–572. https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3777

Nowakowski, T. J., Bhaduri, A., Pollen, A. A., Alvarado, B., Mostajo-Radji, M. A., Di Lullo, E., Haeussler, M., Sandoval-Espinosa, C., Liu, S. J., Velmeshev, D., Ounadjela, J. R., Shuga, J., Wang, X., Lim, D. A., West, J. A., Leyrat, A. A., Kent, W. J., & Kriegstein, A. R. (2017). Spatiotemporal gene expression trajectories reveal developmental hierarchies of the human cortex. *Science*, *358*(6368), 1318–1323. https://doi.org/10.1126/science.aap8809

Ogawa, M., Miyata, T., Nakajimat, K., Yagyu, K., Seike, M., Ikenaka, K., Yamamoto, H., & Mikoshibat, K. (1995). The reeler gene-associated antigen on cajal-retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron*, *14*(5), 899–912. https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90329-1

Ohkubo, T., & Ozawa, M. (1999). p120(ctn) binds to the membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain and is involved in modulation of adhesion activity. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(30), 21409–21415. https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.21409

Ohshima, T., Hirasawa, M., Tabata, H., Mutoh, T., Adachi, T., Suzuki, H., Saruta, K., Iwasato, T., Itohara, S., Hashimoto, M., Nakajima, K., Ogawa, M., Kulkarni, A. B., & Mikoshiba, K. (2007). Cdk5 is required for multipolar-to-bipolar transition during neuronal migration and proper dendrite development of pyramidal neurons in the cerebral cortex. *Development*, *134*(12), 2273–2282. https://doi.org/10.1242/dev.02854

Ohta, Y., Hartwig, J. H., & Stossel, T. P. (2006). FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nature Cell Biology*, *8*(8), 803–814. https://doi.org/10.1038/ncb1437

Ohta, Y., Suzuki, N., Nakamura, S., Hartwig, J. H., & Stossel, T. P. (1999). The small GTPase RaIA targets filamin to induce filopodia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(5), 2122–2128. https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2122

Ohtaka-Maruyama, C. (2020). Subplate Neurons as an Organizer of Mammalian Neocortical Development. *Frontiers in Neuroanatomy*, *14*(March), 1–9. https://doi.org/10.3389/fnana.2020.00008

Ohtaka-Maruyama, C., Okamoto, M., Endo, K., Oshima, M., Kaneko, N., Yura, K., Okado, H., Miyata, T., & Maeda, N. (2018). Synaptic transmission from subplate neurons controls radial migration of neocortical neurons. *Science*, *360*(6386), 313–317. https://doi.org/10.1126/science.aar2866

Oishi, K., Aramaki, M., & Nakajima, K. (2016). Mutually repressive interaction between Brn1/2 and Rorb contributes to the establishment of neocortical layer 2/3 and layer 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(12), 3371–3376. https://doi.org/10.1073/pnas.1515949113

Oishi, K., Nakagawa, N., Tachikawa, K., Sasaki, S., Aramaki, M., Hirano, S., Yamamoto, N., Yoshimura, Y., & Nakajima, K. (2016). Identity of neocortical layer 4 neurons is specified through correct positioning into the cortex. *ELife*, *5*(FEBRUARY2016), 1–26. https://doi.org/10.7554/eLife.10907

Oishi, K., Nakajima, K., & Motoyama, J. (2022). Activation of Sonic Hedgehog Signaling Promotes Differentiation of Cortical Layer 4 Neurons via Regulation of Their Cell Positioning. *Journal of Developmental Biology*, *10*(4). https://doi.org/10.3390/jdb10040050

Okur, Z., Schlauri, N., Bitsikas, V., Panopoulou, M., Ortiz, R., Schwaiger, M., Karmakar, K., Schreiner, D., & Scheiffele, P. (2024). Control of neuronal excitation–inhibition balance by BMP–SMAD1 signalling. *Nature*, *629*(8011), 402–409. https://doi.org/10.1038/s41586-024-07317-z

Olson, E. C. (2014). Analysis of preplate splitting and early cortical development illuminates the biology of neurological disease. *Frontiers in Pediatrics*, *2*(NOV), 1–9. https://doi.org/10.3389/fped.2014.00121

O'Neill, A. C., Kyrousi, C., Einsiedler, M., Burtscher, I., Drukker, M., Markie, D. M., Kirk, E. P., Götz, M., Robertson, S. P., & Cappello, S. (2018). Mob2 insufficiency disrupts neuronal migration in the developing cortex. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*(March), 1–13. https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00057

O'Roak, B., Vives, L., Girirajan, S., Karakoc, E., Krumm, N., Coe, B. P., Levy, R., Ko, A., Lee, C., Smith, J. D., Turner, E. H., Stanaway, I. B., Vernot, B., Malig, M., Baker, C., Akey, J. M., Borenstein, E., Rieder, M. J., Nickerson, D. A., … Eichler, E. E. (2012). Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature*, *485*(7397), 246–250. https://doi.org/10.1038/nature10989

Ozawa, M., & Kemler, R. (1992). Molecular organization of the uvomorulin-catenin complex. *Journal of Cell Biology*, *116*(4), 989–996. https://doi.org/10.1083/jcb.116.4.989

Pagnamenta, A. T., Khan, H., Walker, S., Gerrelli, D., Wing, K., Bonaglia, M. C., Giorda, R., Berney, T., Mani, E., Molteni, M., Pinto, D., Le Couteur, A., Hallmayer, J., Sutcliffe, J. S., Szatmari, P., Paterson, A. D., Scherer, S. W., Vieland, V. J., & Monaco, A. P. (2011). Rare familial 16q21 microdeletions under a linkage peak implicate cadherin 8 (CDH8) in susceptibility to autism and learning disability. *Journal of Medical Genetics*, *48*(1), 48–54. https://doi.org/10.1136/jmg.2010.079426

Paridaen, J. T., & Huttner, W. B. (2014). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Reports*, *15*(4), 351–364. https://doi.org/10.1002/embr.201438447

Parrini, E., Conti, V., Dobyns, W. B., & Guerrini, R. (2016). Genetic basis of brain malformations. *Molecular Syndromology*, *7*(4), 220–233. https://doi.org/10.1159/000448639

Parrini, E., Ramazzotti, A., Dobyns, W. B., Mei, D., Moro, F., Veggiotti, P., Marini, C., Brilstra, E. H., Bernardina, B. D., Goodwin, L., Bodell, A., Jones, M. C., Nangeroni, M., Palmeri, S., Said, E., Sander, J. W., Striano, P., Takahashi, Y., Van Maldergem, L., … Guerrini, R. (2006). Periventricular heterotopia: Phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin a mutations. *Brain*, *129*(7), 1892–1906. https://doi.org/10.1093/brain/awl125

Pastushenko, I., Mauri, F., Song, Y., de Cock, F., Meeusen, B., Swedlund, B., Impens, F., Van Haver, D., Opitz, M., Thery, M., Bareche, Y., Lapouge, G., Vermeersch, M., Van Eycke, Y. R., Balsat, C., Decaestecker, C., Sokolow, Y., Hassid, S., Perez-Bustillo, A., … Blanpain, C. (2021). Fat1 deletion promotes hybrid EMT state, tumour stemness and metastasis. *Nature*, *589*(7842), 448–455. https://doi.org/10.1038/s41586-020-03046-1

Patrosso, M. C., Repetto, M., Villa, A., Milanesi, L., Frattini, A., Faranda, S., Mancini, M., Maestrini, E., Toniolo, D., & Vezzoni, P. (1994). The exon-intron organization of the human x-linked gene (fln1) encoding actin-binding protein 280. In *Genomics* (Vol. 21, Issue 1, pp. 71–76). https://doi.org/10.1006/geno.1994.1226

Peddibhotla, S., Nagamani, S. C. S., Erez, A., Hunter, J. V., Holder, J. L., Carlin, M. E., Bader, P. I., Perras, H. M. F., Allanson, J. E., Newman, L., Simpson, G., Immken, L. D., Powell, E., Mohanty, A., Kang, S. H. L., Stankiewicz, P., Bacino, C. A., Bi, W., Patel, A., & Cheung, S. W. (2015). Delineation of candidate genes responsible for structural brain abnormalities in patients with terminal deletions of chromosome 6q27. *European Journal of Human Genetics*, *23*(1), 54–60. https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.51

Peng, Z., Gong, Y., & Liang, X. (2021). *Role of FAT1 in health and disease (Review)*. 1–13. https://doi.org/10.3892/ol.2021.12659

Penisson, M., Ladewig, J., Belvindrah, R., & Francis, F. (2019). Genes and Mechanisms Involved in the Generation and Amplification of Basal Radial Glial Cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*(August), 1–21. https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00381

Pentikäinen, U., & Ylänne, J. (2009). The Regulation Mechanism for the Auto-Inhibition of Binding of Human Filamin A to Integrin. *Journal of Molecular Biology*, *393*(3), 644–657. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.08.035

Pereda, A. E. (2014). Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, *15*(4), 250–263. https://doi.org/10.1038/nrn3708

Peters, A., & Kaiserman-Abramof, I. R. (1970). The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *American Journal of Anatomy*, *127*(4), 321–355. https://doi.org/10.1002/aja.1001270402

Peyre, E., Silva, C. G., & Nguyen, L. (2015). Crosstalk between intracellular and extracellular signals regulating interneuron production, migration and integration into the cortex. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*(APR), 1–18. https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00129

Pilz, D. T., Julie, K., Matsumoto, N., Bodurtha, J., Bernadi, B., Tassinari, C. A., Dobyns, W. B., & Ledbetter, D. H. (1999). Subcortical band heterotopia in rare affected males can be caused by missense mutations in DCX(XLIS) or LIS1. *Human Molecular Genetics*, *8*(9), 1757–1760. https://doi.org/10.1093/hmg/8.9.1757

Pisano, T., Barkovich, A. J., Leventer, R. J., Squier, W., Scheffer, I. E., Parrini, E., Blaser, S., Marini, C., Robertson, S., Tortorella, G., Rosenow, F., Thomas, P., McGillivray, G., Andermann, E., Andermann, F., Berkovic, S. F., Dobyns, W. B., & Guerrini, R. (2012).

Peritrigonal and temporo-occipital heterotopia with corpus callosum and cerebellar dysgenesis. *Neurology*, *79*(12), 1244–1251. https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31826aac88

Pizzo, F., Roehri, N., Catenoix, H., Medina, S., McGonigal, A., Giusiano, B., Carron, R., Scavarda, D., Ostrowsky, K., Lepine, A., Boulogne, S., Scholly, J., Hirsch, E., Rheims, S., Bénar, C. G., & Bartolomei, F. (2017). Epileptogenic networks in nodular heterotopia: A stereoelectroencephalography study. *Epilepsia*, *58*(12), 2112–2123. https://doi.org/10.1111/epi.13919

Pokutta, S., HERRENKNECHT, K., KEMLER, R., & ENGEL, J. (1994). Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *European Journal of Biochemistry*, *223*(3), 1019–1026. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb19080.x

Polioudakis, D., de la Torre-Ubieta, L., Langerman, J., Elkins, A. G., Shi, X., Stein, J. L., Vuong, C. K., Nichterwitz, S., Gevorgian, M., Opland, C. K., Lu, D., Connell, W., Ruzzo, E. K., Lowe, J. K., Hadzic, T., Hinz, F. I., Sabri, S., Lowry, W. E., Gerstein, M. B., … Geschwind, D. H. (2019). A Single-Cell Transcriptomic Atlas of Human Neocortical Development during Mid-gestation. *Neuron*, *103*(5), 785-801.e8. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.06.011

Pollen, A. A., Bhaduri, A., Andrews, M. G., Nowakowski, T. J., Meyerson, O. S., Mostajo-Radji, M. A., Di Lullo, E., Alvarado, B., Bedolli, M., Dougherty, M. L., Fiddes, I. T., Kronenberg, Z. N., Shuga, J., Leyrat, A. A., West, J. A., Bershteyn, M., Lowe, C. B., Pavlovic, B. J., Salama, S. R., … Kriegstein, A. R. (2019). Establishing Cerebral Organoids as Models of Human-Specific Brain Evolution. *Cell*, *176*(4), 743-756.e17. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.017

Polleux, F., Morrow, T., & Ghosh, A. (2000). Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature*, *404*(6778), 567–573. https://doi.org/10.1038/35007001

Polleux, F., & Snider, W. (2010). Initiating and growing an axon. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(4), 1–19. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001925

Polleux, F., Whitford, K. L., Dijkhuizen, P. A., Vitalis, T., Ghosh, A., Inserm, U., & Lépine, D. (2002). *Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling*. *3160*, 3147–3160.

Ponassi, M., Jacques, T. S., Ciani, L., & Ffrench-Constant, C. (1999). Expression of the rat homologue of the Drosophila fat tumour suppressor gene. *Mechanisms of Development*, *80*(2), 207–212. https://doi.org/10.1016/S0925-4773(98)00217-2

Praskova, M., Xia, F., & Avruch, J. (2008). MOBKL1A/MOBKL1B Phosphorylation by MST1 and MST2 Inhibits Cell Proliferation. *Current Biology*, *18*(5), 311–321. https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.02.006

Puppo, F., Dionnet, E., Gaillard, M. C., Gaildrat, P., Castro, C., Vovan, C., Bertaux, K., Bernard, R., Attarian, S., Goto, K., Nishino, I., Hayashi, Y., Magdinier, F., Krahn, M., Helmbacher, F., Bartoli, M., & Lévy, N. (2015). Identification of variants in the 4q35 gene FAT1 in patients with a facioscapulohumeral dystrophy-like phenotype. *Human Mutation*, *36*(4), 443–453. https://doi.org/10.1002/humu.22760

Qi, C., Luo, L. Da, Feng, I., & Ma, S. (2022). Molecular mechanisms of synaptogenesis. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, *14*(September), 1–20. https://doi.org/10.3389/fnsyn.2022.939793

Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *Journal of Comparative Neurology*, *145*(1), 61–83. https://doi.org/10.1002/cne.901450105

Rakotomamonjy, J., Rylaarsdam, L., Fares-Taie, L., McDermott, S., Davies, D., Yang, G., Fagbemi, F., Epstein, M., Fairbanks-Santana, M., Rozet, J. M., & Guemez-Gamboa, A. (2023). PCDH12 loss results in premature neuronal differentiation and impeded

migration in a cortical organoid model. *Cell Reports*, *42*(8). https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112845
Reddy, B. V. V. G., & Irvine, K. D. (2008). The fat and warts signaling pathways: New insights into their regulation, mechanism and conservation. *Development*, *135*(17), 2827–2838. https://doi.org/10.1242/dev.020974
Redies, C., Hertel, N., & Hübner, C. A. (2012). Cadherins and neuropsychiatric disorders. *Brain Research*, *1470*, 130–144. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.06.020
Reinhard, M., Halbrügge, M., Scheer, U., Wiegand, C., Jockusch, B. M., & Walter, U. (1992). The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *The EMBO Journal*, *11*(6), 2063–2070. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05264.x
Rentzsch, P., Witten, D., Cooper, G. M., Shendure, J., & Kircher, M. (2019). CADD: Predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D886–D894. https://doi.org/10.1093/nar/gky1016
Rijckmans, E., Stouffs, K., & Jansen, A. C. (2024). Diagnostic work-up in malformations of cortical development. *Developmental Medicine and Child Neurology*, *66*(8), 974–989. https://doi.org/10.1111/dmcn.15882
Riva, M., Genescu, I., Habermacher, C., Orduz, D., Ledonne, F., Rijli, F. M., López-Bendito, G., Coppola, E., Garel, S., Angulo, M. C., & Pierani, A. (2019). Activity-dependent death of transient cajal-retzius neurons is required for functional cortical wiring. *ELife*, *8*(i), 1–18. https://doi.org/10.7554/eLife.50503
Rock, R., Schrauth, S., & Gessler, M. (2005). Expression of mouse dchs1, fjx1, and fat-j suggests conservation of the planar cell polarity pathway identified in Drosophila. *Developmental Dynamics*, *234*(3), 747–755. https://doi.org/10.1002/dvdy.20515
Rosário, M., Schuster, S., Jüttner, R., Parthasarathy, S., Tarabykin, V., & Birchmeier, W. (2012). Neocortical dendritic complexity is controlled during development by NOMA-GAP-dependent inhibition of Cdc42 and activation of cofilin. *Genes and Development*, *26*(15), 1743–1757. https://doi.org/10.1101/gad.191593.112
Rottner, K., Behrendt, B., Small, J. V., & Wehland, J. (1999). VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nature Cell Biology*, *1*(5), 321–322. https://doi.org/10.1038/13040
Runge, K., Cardoso, C., & de Chevigny, A. (2020). Dendritic Spine Plasticity: Function and Mechanisms. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, *12*(August). https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00036
Runge, K., Mathieu, R., Bugeon, S., Lafi, S., Beurrier, C., Sahu, S., Schaller, F., Loubat, A., Herault, L., Gaillard, S., Pallesi-Pocachard, E., Montheil, A., Bosio, A., Rosenfeld, J. A., Hudson, E., Lindstrom, K., Mercimek-Andrews, S., Jeffries, L., van Haeringen, A., … de Chevigny, A. (2021). Disruption of NEUROD2 causes a neurodevelopmental syndrome with autistic features via cell-autonomous defects in forebrain glutamatergic neurons. *Molecular Psychiatry*, *May*. https://doi.org/10.1038/s41380-021-01179-x
Saburi, S., Hester, I., Goodrich, L., & McNeill, H. (2012). Functional interactions between Fat family cadherins in tissue morphogenesis and planar polarity. *Development*, *139*(10), 1806–1820. https://doi.org/10.1242/dev.077461
Sadeqzadeh, E., Bock, C. E. de, & Thorne, R. F. (2013). Sleeping Giants: Emerging Roles for the Fat Cadherins in Health and Disease. *Harvard Business Review*, *86*(6), 84–92. https://doi.org/10.1002/med
Sadeqzadeh, E., De Bock, C. E., Zhang, X. D., Shipman, K. L., Scott, N. M., Song, C., Yeadon, T., Oliveira, C. S., Jin, B., Hersey, P., Boyd, A. W., Burns, G. F., & Thorne, R. F. (2011). Dual processing of FAT1 cadherin protein by human melanoma cells generates distinct protein products. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(32), 28181–28191. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.234419

Sahara, S., & O'Leary, D. D. M. (2009). Fgf10 regulates transition period of cortical stem cell differentiation to radial glia controlling generation of neurons and basal progenitors. *Neuron*, *63*(1), 48–62. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.06.006

Sahu, M. R., & Mondal, A. C. (2021). Neuronal Hippo signaling: From development to diseases. *Developmental Neurobiology*, *81*(2), 92–109. https://doi.org/10.1002/dneu.22796

Sahu, S., Buhler, E., Vermoyal, J. C., Watrin, F., Represa, A., & Manent, J. B. (2019). Spontaneous epileptiform activity in a rat model of bilateral subcortical band heterotopia. *Epilepsia*, *60*(2), 337–348. https://doi.org/10.1111/epi.14633

Saito, K., Kawasoe, R., Sasaki, H., Kawaguchi, A., & Miyata, T. (2018). Neural Progenitor Cells Undergoing Yap/Tead-Mediated Enhanced Self-Renewal Form Heterotopias More Easily in the Diencephalon than in the Telencephalon. *Neurochemical Research*, *43*(1), 171–180. https://doi.org/10.1007/s11064-017-2390-x

Saito, Y., Miyashita, S., Yokoyama, A., Komaki, H., Seki, A., Maegaki, Y., & Ohno, K. (2007). Facioscapulohumeral muscular dystrophy with severe mental retardation and epilepsy. *Brain and Development*, *29*(4), 231–233. https://doi.org/10.1016/j.braindev.2006.08.012

Salatino-Oliveira, A., Genro, J. P., Polanczyk, G., Zeni, C., Schmitz, M., Kieling, C., Anselmi, L., Menezes, A. M. B., Barros, F. C., Polina, E. R., Mota, N. R., Grevet, E. H., Bau, C. H. D., Rohde, L. A., & Hutz, M. H. (2015). Cadherin-13 gene is associated with hyperactive/impulsive symptoms in attention/deficit hyperactivity disorder. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, *168*(3), 162–169. https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32293

Samarin, S., Romero, S., Kocks, C., Didry, D., Pantaloni, D., & Carlier, M. F. (2003). How VASP enhances actin-based motility. *Journal of Cell Biology*, *163*(1), 131–142. https://doi.org/10.1083/jcb.200303191

Sanders, S. J., Ercan-Sencicek, A. G., Hus, V., Luo, R., Murtha, M. T., Moreno-De-Luca, D., Chu, S. H., Moreau, M. P., Gupta, A. R., Thomson, S. A., Mason, C. E., Bilguvar, K., Celestino-Soper, P. B. S., Choi, M., Crawford, E. L., Davis, L., Davis Wright, N. R., Dhodapkar, R. M., DiCola, M., … State, M. W. (2011). Multiple Recurrent De Novo CNVs, Including Duplications of the 7q11.23 Williams Syndrome Region, Are Strongly Associated with Autism. *Neuron*, *70*(5), 863–885. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.002

Santiago, C., & Bashaw, J. (2014). Transcription factors and effectors that regulate neuronal morphology. *Development (Cambridge)*, *141*(24), 4667–4680. https://doi.org/10.1242/dev.110817

Sauer, F. C. (1935). Mitosis in the neural tube. *Journal of Comparative Neurology*, *62*(2), 377–405. https://doi.org/10.1002/cne.900620207

Saugier-Veber, P., Marguet, F., Lecoquierre, F., Adle-Biassette, H., Guimiot, F., Cipriani, S., Patrier, S., Brasseur-Daudruy, M., Goldenberg, A., Layet, V., Capri, Y., Gérard, M., Frébourg, T., & Laquerrière, A. (2017). Hydrocephalus due to multiple ependymal malformations is caused by mutations in the MPDZ gene. *Acta Neuropathologica Communications*, *5*(1), 36. https://doi.org/10.1186/s40478-017-0438-4

Schaar, B. T., & McConnell, S. K. (2005). Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(38), 13652–13657. https://doi.org/10.1073/pnas.0506008102

Schwartz, M. L., Rakic, P., & Goldman-Rakic, P. S. (1991). Early phenotype expression of cortical neurons: Evidence that a subclass of migrating neurons have callosal axons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(4), 1354–1358. https://doi.org/10.1073/pnas.88.4.1354

Scott, J. A., Shewan, A. M., Elzen, N. R. den, Loureiro, J. J., Gertler, F. B., & S.Yap, A. (2005). Ena/VASP Proteins Can Regulate Distinct Modes of Actin Organization at

Cadherin-adhesive Contacts. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(November), 5356–5372. https://doi.org/10.1091/mbc.E05

Sekine, K., Honda, T., Kawauchi, T., Kubo, K. ichiro, & Nakajima, K. (2011). The outermost region of the developing cortical plate is crucial for both the switch of the radial migration mode and the dab1-dependent "inside-out" lamination in the neocortex. *Journal of Neuroscience*, *31*(25), 9426–9439. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0650-11.2011

Sekine, K., Kawauchi, T., Kubo, K. I., Honda, T., Herz, J., Hattori, M., Kinashi, T., & Nakajima, K. (2012). Reelin Controls Neuronal Positioning by Promoting Cell-Matrix Adhesion via Inside-Out Activation of Integrin α5β1. *Neuron*, *76*(2), 353–369. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.07.020

Severino, M., Geraldo, A. F., Utz, N., Tortora, D., Pogledic, I., Klonowski, W., Triulzi, F., Arrigoni, F., Mankad, K., Leventer, R. J., Mancini, G. M. S., Barkovich, J. A., Lequin, M. H., & Rossi, A. (2020). Definitions and classification of malformations of cortical development: Practical guidelines. *Brain*, *143*(10), 2874–2894. https://doi.org/10.1093/brain/awaa174

Shapiro, L., Fannon, A. M., Kwong, P. D., Thompson, A., Lehmann, M. S., Grübel, G., Legrand, J. F., Als-Nielson, J., Colman, D. R., & Hendrickson, W. A. (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Merck Spectrum*, *2*(067), 24–25. https://doi.org/067

Shapiro, L., & Weis, W. I. (2009). Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *1*(3). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003053

Sharma, P., & McNeill, H. (2013). Fat and Dachsous Cadherins. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 116). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00010-8

Sheen, V. L. (2014). Filamin A mediated Big2 dependent endocytosis: From apical abscission to periventricular heterotopia. *Tissue Barriers*, *2*(1). https://doi.org/10.4161/tisb.29431

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., … Walsh, C. A. (2001). Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females. *Human Molecular Genetics*, *10*(17), 1775–1783. https://doi.org/10.1093/hmg/10.17.1775

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. *Human Molecular Genetics*, *11*(23), 2845–2854. https://doi.org/10.1093/hmg/11.23.2845

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. (2003). *Mutations in ARFGEF2 implicate vesicle trafficking in neural progenitor proliferation and migration in the human cerebral cortex*. *36*(1), 69–76. https://doi.org/10.1038/ng1276

Shikanai, M., Nakajima, K., & Kawauchi, T. (2011). N-Cadherin regulates radial glial fiber-dependent migration of cortical locomoting neurons. *Communicative & Integrative Biology*, *4*(3), 326–330. https://doi.org/10.4161/cib.4.3.14886

Shikata, Y., Okada, T., Hashimoto, M., Ellis, T., Matsumaru, D., Shiroishi, T., Ogawa, M., Wainwright, B., & Motoyama, J. (2011). Ptch1-mediated dosage-dependent action of Shh signaling regulates neural progenitor development at late gestational stages. *Developmental Biology*, *349*(2), 147–159. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.10.014

Shimojima, K., Ondo, Y., Nishi, E., Mizuno, S., Ito, M., Ioi, A., Shimizu, M., Sato, M., Inoue, M., Okamoto, N., & Yamamoto, T. (2016). Loss-of-function mutations and global

rearrangements in GPC3 in patients with Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Human Genome Variation*, *3*(August), 10–12. https://doi.org/10.1038/hgv.2016.33
Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., & Ben-Ze'ev, A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the β-catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(10), 5522–5527. https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5522
Silva, C. G., Peyre, E., & Nguyen, L. (2019). Cell migration promotes dynamic cellular interactions to control cerebral cortex morphogenesis. *Nature Reviews Neuroscience*, *20*(6), 318–329. https://doi.org/10.1038/s41583-019-0148-y
Silverman, J. L., Yang, M., Lord, C., & Crawley, J. N. (2010). Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(7), 490–502. https://doi.org/10.1038/nrn2851
Singh, S. M., Castellani, C., & O'Reilly, R. (2010). Autism meets schizophrenia via cadherin pathway. *Schizophrenia Research*, *116*(2–3), 293–294. https://doi.org/10.1016/j.schres.2009.09.031
Sklar, P., Smoller, J. W., Fan, J., Ferreira, M. A. R., Perlis, R. H., Chambert, K., Nimgaonkar, V. L., McQueen, M. B., Faraone, S. V., Kirby, A., De Bakker, P. I. W., Ogdie, M. N., Thase, M. E., Sachs, G. S., Todd-Brown, K., Gabriel, S. B., Sougnez, C., Gates, C., Blumenstiel, B., … Purcell, S. M. (2008). Whole-genome association study of bipolar disorder. *Molecular Psychiatry*, *13*(6), 558–569. https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002151
Slavotinek, A., Kaylor, J., Pierce, H., Cahr, M., Deward, S. J., Schneidman-Duhovny, D., Alsadah, A., Salem, F., Schmajuk, G., & Mehta, L. (2015). CRB2 mutations produce a phenotype resembling congenital nephrosis, Finnish type, with cerebral ventriculomegaly and raised alpha-fetoprotein. *American Journal of Human Genetics*, *96*(1), 162–169. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.11.013
Slavotinek, A. M. (2016). The Family of Crumbs Genes and Human Disease. *Molecular Syndromology*, *7*(5), 274–281. https://doi.org/10.1159/000448109
Smart, I. H. (1973). Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the mouse neocortex: a pilot study based on recording the number, location and plane of cleavage of mitotic figures. *Journal of Anatomy*, *116*(Pt 1), 67–91. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4777782%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1271551
Solnica-Krezel, L., & Sepich, D. S. (2012). Gastrulation: Making and shaping germ layers. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *28*, 687–717. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154043
Sopko, R., Silva, E., Clayton, L., Gardano, L., Barrios-Rodiles, M., Wrana, J., Varelas, X., Arbouzova, N. I., Shaw, S., Saburi, S., Matakatsu, H., Blair, S., & McNeill, H. (2009). Phosphorylation of the Tumor Suppressor Fat Is Regulated by Its Ligand Dachsous and the Kinase Discs Overgrown. *Current Biology*, *19*(13), 1112–1117. https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.05.049
Staley, K. (2015). Molecular mechanisms of epilepsy. *Nature Neuroscience*, *18*(3), 367–372. https://doi.org/10.1038/nn.3947
Stancik, E. K., Navarro-Quiroga, I., Sellke, R., & Haydar, T. F. (2010). Heterogeneity in ventricular zone neural precursors contributes to neuronal fate diversity in the postnatal neocortex. *Journal of Neuroscience*, *30*(20), 7028–7036. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6131-09.2010
Stürner, T., Tatarnikova, A., Mueller, J., Schaffran, B., Cuntz, H., Zhang, Y., Nemethova, M., Bogdan, S., Small, V., & Tavosanis, G. (2019). Transient localization of the arp2/3 complex initiates neuronal dendrite branching in vivo. *Development (Cambridge)*, *146*(7). https://doi.org/10.1242/dev.171397
Südhof, T. C. (2012). The presynaptic active zone. *Neuron*, *75*(1), 11–25. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.012

Südhof, T. C. (2021). The cell biology of synapse formation. *Journal of Cell Biology*, *220*(7), 1–18. https://doi.org/10.1083/jcb.202103052

Südhof, T. C., & Rothman, J. E. (2009). Membrane fusion: Grappling with SNARE and SM proteins. *Science*, *323*(5913), 474–477. https://doi.org/10.1126/science.1161748

Sultan, K. T., & Shi, S. H. (2018). Generation of diverse cortical inhibitory interneurons. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, *7*(2), 1–28. https://doi.org/10.1002/wdev.306

Suo, L., Lu, H., Ying, G., Capecchi, M. R., & Wu, Q. (2012). Protocadherin clusters and cell adhesion kinase regulate dendrite complexity through Rho GTPase. *Journal of Molecular Cell Biology*, *4*(6), 362–376. https://doi.org/10.1093/jmcb/mjs034

Tabata, H., & Nakajima, K. (2003). Multipolar Migration: The Third Mode of Radial Neuronal Migration in the Developing Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience*, *23*(31), 9996–10001. https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-31-09996.2003

Takeichi, M. (1977). *FUNCTIONAL C O R R E L A T I O N BETWEEN CELL A D H E S I V E PROPERTIES AND SOME CELL SURFACE PROTEINS*. 464–474.

Takeichi, M. (2007). The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*(1), 11–20. https://doi.org/10.1038/nrn2043

Tanoue, T., & Takeichi, M. (2004). Mammalian Fat1 cadherin regulates actin dynamics and cell-cell contact. *Journal of Cell Biology*, *165*(4), 517–528. https://doi.org/10.1083/jcb.200403006

Taverna, E., Götz, M., & Huttner, W. B. (2014). The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex. In *Annual review of cell and developmental biology* (Vol. 30). https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155801

Tawil, R., van der Maarel, S. M., & Tapscott, S. J. (2014). Facioscapulohumeral dystrophy: The path to consensus on pathophysiology. *Skeletal Muscle*, *4*(1), 1–15. https://doi.org/10.1186/2044-5040-4-12

Telley, L., Agirman, G., Prados, J., Amberg, N., Fièvre, S., Oberst, P., Bartolini, G., Vitali, I., Cadilhac, C., Hippenmeyer, S., Nguyen, L., Dayer, A., & Jabaudon, D. (2019). Temporal patterning of apical progenitors and their daughter neurons in the developing neocortex. *Science*, *364*(6440). https://doi.org/10.1126/science.aav2522

Telley, L., & Jabaudon, D. (2018). A mixed model of neuronal diversity. *Nature*, *555*(7697), 452–454. https://doi.org/10.1038/d41586-018-02539-4

Tepass, U. (1999). Genetic analysis of cadherin function in animal morphogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, *11*(5), 540–548. https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)00025-3

Tetsu, O., & McCormick, F. (1999). B-Catenin regulates expression of cyclinD1 in colon carcinoma cells. *Science*, *281*(5382), 1509–1512.

Tissir, F., Ravni, A., Achouri, Y., Riethmacher, D., Meyer, G., & Goffinet, A. M. (2009). DeltaNp73 regulates neuronal survival in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(39), 16871–16876. https://doi.org/10.1073/pnas.0903191106

Tolner, E. A., Sheikh, A., Yukin, A. Y., Kaila, K., & Kanold, P. O. (2012). Subplate neurons promote spindle bursts and thalamocortical patterning in the neonatal rat somatosensory cortex. *Journal of Neuroscience*, *32*(2), 692–702. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1538-11.2012

Tønnesen, J., Katona, G., Rózsa, B., & Nägerl, U. V. (2014). Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nature Neuroscience*, *17*(5), 678–685. https://doi.org/10.1038/nn.3682

Toolan, K. P., McGrath, B. T., Brinkmeier, M. L., Camper, S. A., & Bielas, S. L. (2000). *Ash1l loss-of-function results in structural birth defects and altered cortical development*. *March*, 1–18.

Torii, M., Hashimoto-Torii, K., Levitt, P., & Rakic, P. (2009). Integration of neuronal clones in the radial cortical columns by EphA and ephrin-A signalling. *Nature*, *461*(7263), 524–528. https://doi.org/10.1038/nature08362

Toudji, I., Toumi, A., Chamberland, É., & Rossignol, E. (2023). Interneuron odyssey: molecular mechanisms of tangential migration. *Frontiers in Neural Circuits*, *17*(September), 1–18. https://doi.org/10.3389/fncir.2023.1256455

Trousse, F., Poluch, S., Pierani, A., Dutriaux, A., Bock, H. H., Nagasawa, T., Verdier, J. M., & Rossel, M. (2015). CXCR7 receptor controls the maintenance of subpial positioning of cajal-retzius cells. *Cerebral Cortex*, *25*(10), 3446–3457. https://doi.org/10.1093/cercor/bhu164

Tsai, J. W., Bremner, K. H., & Vallee, R. B. (2007). Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue. *Nature Neuroscience*, *10*(8), 970–979. https://doi.org/10.1038/nn1934

Tsai, J. W., Lian, W. N., Kemal, S., Kriegstein, A. R., & Vallee, R. B. (2010). Kinesin 3 and cytoplasmic dynein mediate interkinetic nuclear migration in neural stem cells. *Nature Neuroscience*, *13*(12), 1463–1472. https://doi.org/10.1038/nn.2665

Tschuluun, N., Jürgen Wenzel, H., Doisy, E. T., & Schwartzkroin, P. A. (2011). Initiation of epileptiform activity in a rat model of periventricular nodular heterotopia. *Epilepsia*, *52*(12), 2304–2314. https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03264.x

Tsukasaki, Y., Miyazaki, N., Matsumoto, A., Nagae, S., Yonemura, S., Tanoue, T., Iwasaki, K., & Takeichi, M. (2014). Giant cadherins Fat and Dachsous self-bend to organize properly spaced intercellular junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(45), 16011–16016. https://doi.org/10.1073/pnas.1418990111

Udvary, D., Harth, P., Macke, J. H., Hege, H. C., de Kock, C. P. J., Sakmann, B., & Oberlaender, M. (2022). The impact of neuron morphology on cortical network architecture. *Cell Reports*, *39*(2), 110677. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110677

Vadlamudi, R. K., Li, F., Adam, L., Nguyen, D., Ohta, Y., Stossel, T. P., & Kumar, R. (2002). Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nature Cell Biology*, *4*(9), 681–690. https://doi.org/10.1038/ncb838

Vaid, S., Camp, J. G., Hersemann, L., Oegema, C. E., Heninger, A. K., Winkler, S., Brandl, H., Sarov, M., Treutlein, B., Huttner, W. B., & Namba, T. (2018). A novel population of hopx-dependent basal radial glial cells in the developing mouse neocortex. *Development (Cambridge)*, *145*(20). https://doi.org/10.1242/dev.169276

Veeraval, L., O'Leary, C. J., & Cooper, H. M. (2020). Adherens Junctions: Guardians of Cortical Development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*(January), 1–17. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00006

Vermoyal, J. C., Hardy, D., Goirand-Lopez, L., Vinck, A., Silvagnoli, L., Fortoul, A., Francis, F., Cappello, S., Bureau, I., Represa, A., Cardoso, C., Watrin, F., Marissal, T., & Manent, J. B. (2024). Grey matter heterotopia subtypes show specific morpho-electric signatures and network dynamics. *Brain*, *147*(3), 996–1010. https://doi.org/10.1093/brain/awad318

Villalba, A., Götz, M., & Borrell, V. (2021). The regulation of cortical neurogenesis. *Current Topics in Developmental Biology*, *142*, 1–66. https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2020.10.003

Villar-Cerviño, V., Molano-Mazón, M., Catchpole, T., Valdeolmillos, M., Henkemeyer, M., Martínez1, L. M., Borrell, V., & Marín, O. (2013). Contact repulsion controls the dispersion and final distribution of Cajal-Retzius cells. *Neuron*, *23*(1), 1–7. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.11.023.Contact

Wang, H., Ge, G., Uchida, Y., Luu, B., & Ahn, S. (2011). Gli3 is Required for Maintenance and Fate Specification of Cortical Progenitors. *Journal of Neuroscience*, *31*(17), 6440–6448. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4892-10.2011

Wang, K., Zhang, H., Ma, D., Bucan, M., Glessner, J. T., Abrahams, B. S., Salyakina, D., Imielinski, M., Bradfield, J. P., Sleiman, P. M. A., Kim, C. E., Hou, C., Frackelton, E., Chiavacci, R., Takahashi, N., Sakurai, T., Rappaport, E., Lajonchere, C. M., Munson, J., … Hakonarson, H. (2009). Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature*, *459*(7246), 528–533. https://doi.org/10.1038/nature07999

Wang, W. Z., Oeschger, F. M., Montiel, J. F., García-Moreno, F., Hoerder-Suabedissen, A., Krubitzer, L., Ek, C. J., Saunders, N. R., Reim, K., Villalón, A., & Molnár, Z. (2011). Comparative aspects of subplate zone studied with gene expression in sauropsids and mammals. *Cerebral Cortex*, *21*(10), 2187–2203. https://doi.org/10.1093/cercor/bhq278

Wang, X., Tsai, J.-W., LaMonica, B., & Kriegstein1, A. R. (2011). A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. *Physiology & Behavior*, *176*(5), 139–148. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801473.The

Ware, T. L., Huskins, S. R., Grinton, B. E., Liu, Y. C., Bennett, M. F., Harvey, M., McMahon, J., Andreopoulos-Malikotsinas, D., Bahlo, M., Howell, K. B., Hildebrand, M. S., Damiano, J. A., Rosenfeld, A., Mackay, M. T., Mandelstam, S., Leventer, R. J., Harvey, A. S., Freeman, J. L., Scheffer, I. E., … Berkovic, S. F. (2019). Epidemiology and etiology of infantile developmental and epileptic encephalopathies in Tasmania. *Epilepsia Open*, *4*(3), 504–510. https://doi.org/10.1002/epi4.12350

Watrin, F., Manent, J. B., Cardoso, C., & Represa, A. (2015). Causes and consequences of gray matter heterotopia. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, *21*(2), 112–122. https://doi.org/10.1111/cns.12322

Welagen, J., & Anderson, S. (2011). Origins of neocortical interneurons in mice. *Developmental Neurobiology*, *71*(1), 10–17. https://doi.org/10.1002/dneu.20857

Whitford, K. L., Marillat, V., Stein, E., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M., Chédotal, A., & Ghosh, A. (2002). Regulation of cortical dendrite development by Slit-Robo interactions. *Neuron*, *33*(1), 47–61. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00566-9

Woodworth, M. B., Custo Greig, L., Kriegstein, A. R., & MacKlis, J. D. (2012). Snapshot: Cortical development. *Cell*, *151*(4). https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.004

Wrobel, C. N., Mutch, C. A., Swaminathan, S., Taketo, M. M., & Chenn, A. (2007). Persistent expression of stabilized β-catenin delays maturation of radial glial cells into intermediate progenitors. *Developmental Biology*, *309*(2), 285–297. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.07.013

Yagi, T. (2008). Clustered protocadherin family. *Development Growth and Differentiation*, *50*(SUPPL. 1). https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.00991.x

Yamaguchi, T. P. (2001). Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. *Current Biology*, *11*(17), 713–724. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00417-1

Yang, C., Li, X., Zhang, B., Fu, S., Li, S., Shen, J., Guan, L., Qiao, L., & Lin, J. (2019). The Mechanism of Rap1 Regulates N-cadherin to Control Neuronal Migration. *Journal of Molecular Neuroscience*, *68*(4), 539–548. https://doi.org/10.1007/s12031-019-01316-w

Ye, X., Qiu, Y., Gao, Y., Wan, D., & Zhu, H. (2019). A subtle network mediating axon guidance: Intrinsic dynamic structure of growth cone, attractive and repulsive molecular cues, and the intermediate role of signaling pathways. *Neural Plasticity*, *2019*. https://doi.org/10.1155/2019/1719829

Yin, F., Yu, J., Zheng, Y., Chen, Q., Zhang, N., & Pan, D. (2013). Spatial organization of hippo signaling at the plasma membrane mediated by the tumor suppressor merlin/NF2. *Cell*, *154*(6), 1342. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.025

Yoshida-Noro, C., Suzuki, N., & Takeichi, M. (1984). Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Developmental Biology*, *101*(1), 19–27. https://doi.org/10.1016/0012-1606(84)90112-X

Yoshinaga, S., Ohkubo, T., Sasaki, S., Nuriya, M., Ogawa, Y., Yasui, M., Tabata, H., & Nakajima, K. (2012). A phosphatidylinositol lipids system, lamellipodin, and Ena/VASP

regulate dynamic morphology of multipolar migrating cells in the developing cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*, *32*(34), 11643–11656. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0738-12.2012

Yoshinaga, S., Shin, M., Kitazawa, A., Ishii, K., Tanuma, M., Kasai, A., Hashimoto, H., Kubo, K. ichiro, & Nakajima, K. (2021). Comprehensive characterization of migration profiles of murine cerebral cortical neurons during development using FlashTag labeling. *IScience*, *24*(4), 102277. https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102277

Zhang, J., Neal, J., Lian, G., Hu, J., Lu, J., & Sheen, V. (2013). Filamin a regulates neuronal migration through brefeldin a-inhibited guanine exchange factor 2-dependent Arf1 activation. *Journal of Neuroscience*, *33*(40), 15735–15746. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1939-13.2013

Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z. C., & Guan, K. L. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes and Development*, *21*(21), 2747–2761. https://doi.org/10.1101/gad.1602907

Zhao, B., Ye, X., Yu, J., Li, L., Li, W., Li, S., Yu, J., Lin, J. D., Wang, C. Y., Chinnaiyan, A. M., Lai, Z. C., & Guan, K. L. (2008). TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes and Development*, *22*(14), 1962–1971. https://doi.org/10.1101/gad.1664408

Zhao, X., Yang, C. H., & Simon, M. A. (2013). The Drosophila Cadherin Fat Regulates Tissue Size and Planar Cell Polarity through Different Domains. *PLoS ONE*, *8*(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062998

Zhou, A. X., Hartwig, J. H., & Akyürek, L. M. (2010). Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends in Cell Biology*, *20*(2), 113–123. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.12.001

Zhou, J., Kang, X., An, H., Lv, Y., & Liu, X. (2021). The function and pathogenic mechanism of filamin A. *Gene*, *784*(September 2020), 145575. https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145575

Ziv, & Smith. (1996). Evidence for a Role of Dendritic Filopodia in Synaptogenesis and Spine Formation. *Neuron*, *17*(5), 91–102.

Zou, D. F., Li, X. Y., Lu, X. G., Wang, H. L., Song, W., Zhang, M. W., Liu, X. R., Li, B. M., Liao, J. X., Zhong, J. M., Meng, H., & Li, B. (2024). Association of FAT1 with focal epilepsy and correlation between seizure relapse and gene expression stage. *Seizure*, *116*(February 2023), 37–44. https://doi.org/10.1016/j.seizure.2023.03.003