

Université de Montréal

Rôles de *Trio* dans la migration des interneurons GABAergiques corticaux

Par François Charron-Ligez

Sous la direction du Dr Elsa Rossignol

Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences biomédicales option  
Médecine expérimentale

Août 2017

© François Charron-Ligez, 2017

## Résumé

Les encéphalopathies épileptogènes (EE) sont des maladies du jeune enfant se présentant avec une épilepsie et un retard du développement et/ou des déficits cognitifs. Le syndrome de West (spasmes infantiles) est une forme d'EE se manifestant au cours des premiers mois de vie par des salves de spasmes en flexion du tronc et des membres et une régression du développement. La pathogenèse des EE est mal comprise, mais des données récentes suggèrent qu'elles peuvent, dans certains cas, refléter un déséquilibre entre l'excitation et l'inhibition des circuits neuronaux dû, par exemple, à un déficit du développement ou de la fonction des interneurons inhibiteurs GABAergiques (INs). Afin de mieux comprendre les causes génétiques des EE, le laboratoire du Dr Rossignol a effectué une étude de séquençage d'exome d'une large cohorte d'enfants avec spasmes infantiles. Cette étude a révélé l'hétérogénéité génétique de cette maladie et a également permis d'identifier des mutations du gène *TRIO* chez un enfant avec spasmes infantiles et déficience intellectuelle. Des mutations de ce gène ont déjà été associées à la déficience intellectuelle chez l'humain. Celui-ci code pour la protéine TRIO, décrite comme essentielle pour la régulation de divers processus impliqués dans la migration neuronale incluant la guidance axonale et la motilité cellulaire. Cependant, ses fonctions dans le développement des INs sont inconnues. Par cette étude, nous avons voulu explorer les rôles de *Trio* dans la migration des INs corticaux chez la souris. À l'aide d'une technique d'électroporation *ex vivo* et d'un shARN contrôlé par le promoteur *Dlx5/6*, nous avons réprimé l'expression de *Trio* spécifiquement dans les INs en période prénatale. Nos résultats montrent que la perte de fonction de *Trio*, chez les souris embryonnaires mène à une réduction de la migration des INs vers le cortex, et à des défauts dans leur morphologie les rendant possiblement inaptes à soutenir l'organisation normale du cerveau. Ces défauts seraient possiblement causés par une sous activation de la voie de signalisation de RhoA.

Mots clés: Développement, Épilepsie, Facteur d'échange de nucléotide guanine Interneurone, Migration, Morphologie, Souris, Trio

## Abstract

Epilepsy can result from a loss of balance between the levels of excitation and inhibition in the brain. Epileptic seizures manifest themselves by uncontrolled limb movements and epileptic activity on brain wave recordings (EEG). Possible defects in the development of inhibitory neurons may cause an increased excitability of the brain cells and underlie such seizures. To better understand the genetic causes of epilepsy, the laboratory of Dr. Rossignol conducted a gene sequencing study of a large cohort of children diagnosed with infantile spasms, a severe form of early-onset epilepsy. Among the newly identified genes, sequencing revealed mutations in the *TRIO* gene. In the literature, this gene was already associated with intellectual disability and was noted as a vital participant for axonal guidance and cellular motility in various organisms. However, little is known about the role of this particular gene in the development of inhibitory neurons. The objective of the study is to investigate the roles of *Trio* in the migration of these inhibitory interneurons in mice by exploring the processes that lead to the migration of these inhibitory neurons to their final position. With the utilization of *ex vivo* electroporation and a shRNA driven by the *Dlx5/6* promoter, we repressed the *Trio* gene in cortical GABAergic interneurons during the prenatal stages of mouse development. Our results demonstrate that the loss of function of the *Trio* gene in embryonic mice leads to defects in the morphology of inhibitory neurons and in a reduced number of interneurons reaching the cortical plate. Our rescue experiment suggests that defects in interneuron morphology might result from deregulation of the RhoA signalling pathway. Overall, our results expand our understanding of the roles of TRIO in the regulation of cortical circuits development.

Key words: Development, Epilepsy, Guanine nucleotide exchange factor, Interneuron, Migration, Morphology, Mouse, Trio

## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	I
<b>Abstract</b> .....	II
<b>Liste des tableaux</b> .....	VI
<b>Liste des figures</b> .....	VII
<b>Abréviations</b> .....	VIII
<b>Remerciements</b> .....	X
<b>Introduction</b> .....	12
Développement embryonnaire des interneurons.....	12
Genèse des INs.....	12
Migration tangentielle des INs.....	13
Substrats de migration et signaux chémotactiques.....	14
Migration radiale et positionnement dans le cortex.....	16
Mécanismes cellulaires et moléculaires de migration des interneurons.....	17
Développement des interneurons postnataux.....	19
Contribution des mécanismes développementaux aux encéphalopathies épileptogènes.....	20
Structure et expression de <i>Trio</i> dans le système nerveux.....	22
Fonctions et régulation de <i>Trio</i> .....	23
Rôles de <i>Trio</i> dans le développement du système nerveux.....	26

Description phénotypique et génotypique des patients atteints de mutation de <i>TRIO</i> .....	27
<b>Hypothèse et objectifs</b> .....	28
<b>Matériel et méthodes</b> .....	30
Construction du plasmide exprimant le shARN anti- <i>Trio</i> .....	30
Construction du plasmide <i>Dlx5/6-RhoAQ63L-IRES-EGFP</i> .....	36
Génotypage des souris par PCR.....	36
Électroporation <i>ex vivo</i> .....	37
Immunohistochimie sur des tranches en culture organotypique.....	38
Perfusion et coupe de cerveaux.....	39
Immunohistochimie sur coupes au cryostat.....	39
Microscopie confocale .....	40
Analyse statistique .....	40
<b>Résultats</b> .....	42
Localisation de TRIO dans les INs GABAergiques corticaux prénataux.....	42
La répression de <i>Trio</i> altère la morphologie des INs GABAergiques en migration.....	42
La forme constitutivement active de RhoA corrige partiellement la perte de fonction de <i>Trio</i> .....	47
TRIO localise dans les INs GABAergiques corticaux matures .....	47
<b>Discussion</b> .....	49
<b>Conclusion</b> .....	54

**Bibliographie** ..... 55

## Liste des tableaux

Tableau 1 - Paramètres des réactions de PCR ayant servi aux différents clonages et au géotypage

## Liste des figures

Figure 1 - Représentation schématique de la migration tangentielle des INs.

Figure 2 - Représentation schématique de la protéine TRIO, de ses multiples domaines et de l'activité des GEFs.

Figure 3 - Carte des plasmides codant pour le shARN anti-*Trio*, RhoA Q63L et l'ADNc de *Trio*.

Figure 4 - Représentation schématique de l'électroporation *ex vivo*.

Figure 5 - Localisation de la protéine TRIO dans les INs GABAergiques corticaux.

Figure 6 - La répression de *Trio* dans les INs GABAergiques en développement mène à une réduction de leur migration.

Figure 7 - La répression de *Trio* dans les INs corticaux en migration mène à des altérations morphologiques.

Figure 8 - Localisation de TRIO dans les INs GABAergiques corticaux matures.

## **Abréviations**

ADNc : ADN codant

CGE : Éminence ganglionnaire caudale

CXCR4 : C-X-C motif chémokine récepteur 4

DH : Domaine catalytique homologue à Dbl

EE : Encéphalopathie épileptogène

GABA : Acide  $\gamma$ -aminobutyrique

GEF : Facteur d'échange de nucléotide guanine

GEFD : Domaine GEF

GFP : Protéine fluorescente verte

Ig : Immunoglobuline

IN : Interneurone GABAergique

IRES : Site d'entrée interne du ribosome

mDia : Protéine diaphane des mammifères

MGE : Éminence ganglionnaire médiane

MLCK : Kinase des chaînes légères de myosine

MT : Microtubule

MTOC : Centre d'organisation des microtubules

PH : Domaine homologue à la pleckstrine

POA : Aire préoptique

PV : Parvalbumine

ROCK : Protéine associé au Rho kinase

SH3: Src homologie 3

shARN: Acide ribonucléique en épingle à cheveux

SRK: Sérine thréonine kinase

SST : Somatostatine

UTR : Région non traduite

ZI : Zone intermédiaire

ZM : Zone marginale

ZSV : Zone sous ventriculaire

ZV : Zone ventriculaire

## **Remerciements**

Je souhaite remercier Dr Elsa Rossignol pour m'avoir donné la chance de faire une maîtrise dans son laboratoire, Mathieu Lachance sans qui les expériences n'auraient pas été possibles, ainsi que les membres du laboratoire présents et passés : Alexis, Dana, Felicia, Jade, James, Jean-David, Lara, Lydia, Maxime et Praveen.

## **Introduction**

### **Développement embryonnaire des interneurones**

Le cortex cérébral se caractérise par un réseau complexe de connexions entre des neurones de projections excitateurs et des interneurones (INs) inhibiteurs qui utilisent respectivement les neurotransmetteurs glutamate et l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) pour moduler leurs cibles synaptiques. Les INs représentent environ 20% des neurones du néocortex chez la souris (Rossignol, 2011). La génération des INs corticaux se produit à partir de trois zones du sous-pallium. L'éminence ganglionnaire médiane (MGE) est à l'origine de 50 à 60% des INs corticaux, l'éminence ganglionnaire caudale (CGE) produit 30 à 40% d'entre eux et l'aire préoptique (POA) en génère environ 4% (Gelman et al., 2012). Le MGE donne naissance à la majorité des INs corticaux incluant les cellules en panier exprimant la parvalbumine (PV) et les INs exprimant la somatostatine (SST), alors que le CGE produit les INs exprimant le peptide vasoactif de l'intestin et les INs exprimant la reeline. La POA génère une minorité d'INs incluant certains exprimant la reeline et le neuropeptide Y (Rossignol, 2011).

### **Genèse des INs**

La génération des INs dans les zones prolifératives du sous-pallium dépend de l'expression de nombreux facteurs de transcription. Les patrons d'expression de ces facteurs caractérisent différentes sous-régions à la fois du MGE, du CGE et du LGE (Flames et al., 2007). Le MGE, par exemple, est défini par une forte expression du facteur de transcription *Nkx2-1* qui est essentiel à la génération de plus de la moitié des INs GABAergiques corticaux (Gelman et al., 2012). Le MGE peut cependant être subdivisé en cinq domaines progéniteurs menant à la génération préférentielle de certains types d'INs (Flames et al., 2007). Ainsi, la partie la plus dorsale de la zone ventriculaire du MGE (pMGE1) exprime de hauts niveaux de *Nkx6-2* et génère en majorité des INs exprimant la SST et une plus petite proportion d'INs PV, tandis que les régions ventrales et la zone la plus rostrale du MGE (pMGE4) sont caractérisées par l'expression des facteurs de transcription *Lhx6* et *Lhx7* qui mènent à une génération accrue d'INs PV (Flames et al., 2007; Wang et al., 2010). Les gènes à boîte homéotiques *Dlx 1, 2, 5 et 6* codent pour des facteurs de transcription et sont tous impliqués dans le développement et la migration des INs corticaux à partir du

télocéphale ventral (Zerucha et al., 2000; Merlo et al., 2000). Les gènes *Dlx 1 et 2* sont largement exprimés dans les INs corticaux immatures et très peu au niveau postnatal. Leurs rôles se situent à la fois dans la régulation de gènes comme *Gad1* codant pour l'enzyme responsable de la production de GABA et dans les processus de différenciation et de migration des neurones GABAergiques, ce qui inclut la suppression de la croissance et du branchement des neurites chez les neurones GABAergiques en migration permettant ainsi la migration tangentielle (Wang et al., 2010; Macdonald et al., 2013; Zerucha et al., 2000). De leur côté, les gènes *Dlx5* et *Dlx6* sont exprimés à la fois par les INs en développement et matures (Wang et al., 2010). Dans le cortex, ces facteurs de transcription sont spécifiques aux INs GABAergiques et régulent étroitement leur génération, leur spécification et leur migration vers le néocortex (Rossignol, 2011; Wang et al., 2010). Environ 95% des INs GABAergiques corticaux vont les exprimer, ce qui inclut presque tous les INs PV (Xu et al., 2003; Wang et al., 2010).

### **Migration tangentielle des INs**

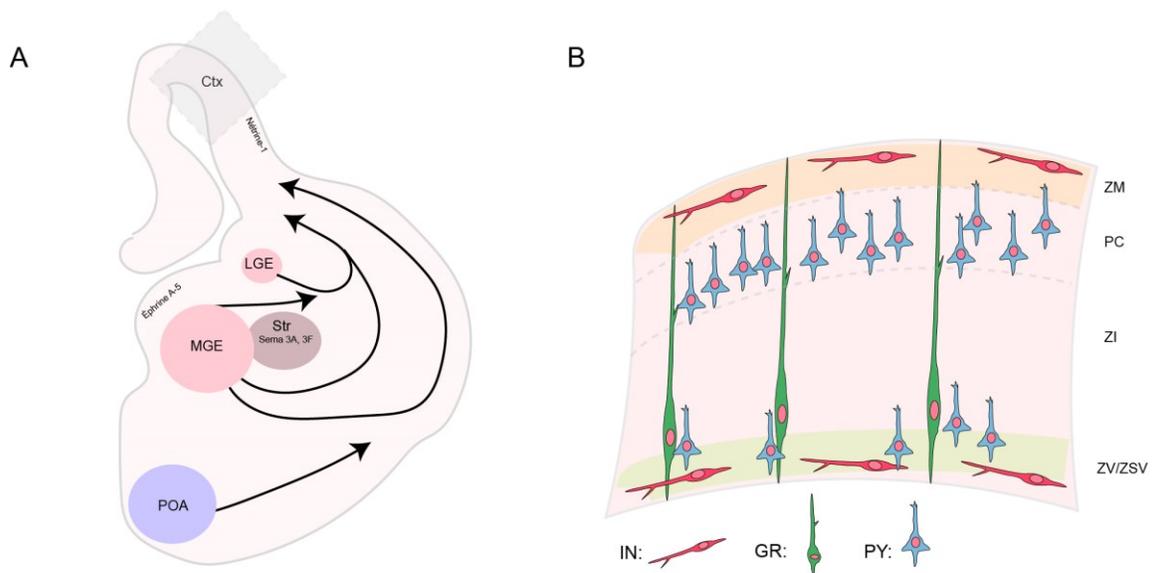
Alors que les cellules pyramidales sont générées dans la zone ventriculaire et migrent de façon radiale le long des glias radiales, les INs migrent tangentiellement à partir du MGE vers la plaque corticale en utilisant différents substrats et molécules de guidance (Valdeolillos et Moya, 2013). Leur progression vers le cortex et la route qu'ils emprunteront vont aussi dépendre de facteurs régulés au niveau temporel et spatial. Ainsi, les INs migrant vers le néocortex empruntent différentes routes incluant un corridor entre les éminences ganglionnaires (GE) et le striatum, et une autre contournant le striatum superficiellement (Marin et Rubenstein, 2001). Au jour embryonnaire 11,5 (E11,5), chez la souris, la migration des INs du MGE va d'abord suivre la zone intermédiaire des éminences ganglionnaires (Marin et Rubenstein, 2001). Puis, pendant les phases terminales de développement du télencéphale, entre E12,5 et E16,5, les INs vont migrer massivement, via la zone sous-ventriculaire, vers les zones prolifératives et intermédiaires du néocortex (Anderson et al., 2001). Le CGE commence à produire des INs plus tardivement (E12,5 à E16,5) et ceux-ci vont occuper préférentiellement les couches superficielles du néocortex (Colasante et Sessa, 2010). Le positionnement des INs en couches s'opère dès E14 et E18 lorsque les neurones commencent à migrer radialement sur les glias radiales vers la plaque corticale (López-Bendito et al., 2008).

## **Substrats de migration et signaux chémoattractifs**

La migration des INs corticaux du MGE vers la plaque corticale est étroitement régulée. Cette régulation dépend essentiellement des récepteurs exprimés à la surface des INs répondant aux protéines sécrétées dans l'environnement et des différents substrats sur lesquels s'effectue la migration. Ces substrats comprennent les cellules progénitrices dans la zone sous-ventriculaire, les fibres corticofugales dans la zone intermédiaire et les neurones postmitotiques du cortex (Bellion et al., 2005). Dans la zone ventriculaire du MGE, l'éphrine-A5 est l'un des premiers signaux orientant la migration des INs corticaux. L'interaction de cette molécule avec le récepteur EphA4 exprimé à la surface des INs corticaux repousserait les INs de la zone ventriculaire du MGE (Berghe et al., 2013). Plusieurs associations ont été faites entre les cellules provenant des éminences ganglionnaires migrant tangentiellement et les réseaux de fibres corticofugales qui envahissent très tôt le cortex pendant le développement (Métin et Godement, 1996). Une étude a décrit que les fibres corticofugales exprimant la molécule d'adhésion TAG-1 sont utilisées comme substrat par les INs GABAergiques en migration vers le cortex (Denaxa et al., 2001). Un mécanisme de tri permettant aux INs GABAergiques corticaux en migration d'éviter le striatum serait sous-tendu par l'expression du récepteur de la neuropiline par les INs corticaux. L'expression de ce récepteur par les INs destinés au cortex permettrait leur répulsion en réponse aux signaux chémorépulsifs des sémaphorines 3A et 3F provenant du striatum (Marin et al., 2001). La sous-population d'INs empruntant le corridor des GE et exprimant le récepteur ErbB4 réagirait alors au signal chémoattracteur induit par la Neureguline-1 qui serait responsable de leur migration vers la plaque corticale (Flames et al., 2004).

Après leur entrée dans la plaque corticale, les INs se dirigent tangentiellement vers la zone marginale, la zone intermédiaire et la zone sous-ventriculaire et leur dispersion dépend de plusieurs signaux de guidance (López-Bendito et al., 2008; Valdeolmillos et Moya, 2013). Au niveau du cortex en développement, la sécrétion de nétrine-1 dans la zone marginale et intermédiaire agirait autant comme agent chémoattracteur que chémorépulsif pour la guidance axonale (DeGeer et al., 2015). Elle serait également nécessaire à la progression et au positionnement des INs exprimant l' $\alpha$ 3-intégrine dans ces zones particulières (Stanco et al., 2008). Parallèlement, la dispersion des INs à partir de la zone

marginale, de la zone intermédiaire et sous ventriculaire vers la plaque corticale va s'effectuer aux stades les plus tardifs de la migration, vers E17.5 (López-Bendito et al., 2008). En effet, aux stades plus précoces, aux alentours de E14.5, les zones marginales, intermédiaires et sous-ventriculaires constituent des zones plus permissives pour la migration des INs de par la présence de CXCL12 promouvant la migration des INs GABAergiques par le récepteur CXCR4 (López-Bendito et al., 2008). Aux stades tardifs, une régulation négative du récepteur CXCR4 des INs serait responsable de la dispersion des INs vers la plaque corticale et du début de la migration radiale (López-Bendito et al., 2008; Sultan et al., 2013).



**Figure 1. Représentation schématique de la migration tangentielle des INs.** Migration tangentielle des INs à partir de diverses zones progénitrices du sous-pallium. Les INs générés dans le MGE empruntent un corridor entre le striatum et le LGE ainsi qu'une route plus superficielle vers le cortex et leur migration est influencée par plusieurs signaux chimiotactiques comme l'éphrine A5, les sémaphorines 3A et 3F et la nétrine-1 (A). Au niveau du cortex, les INs migrent majoritairement dans la zone marginale et la zone ventriculaire avant de migrer radialement (B). Ctx: Cortex; GR: Glias radiales; IN: Interneurone; PC: Plaque corticale; PY: Cellules pyramidales; Sema 3A 3F: Semaphorine 3A 3F Str: Striatum; ZI: Zone intermédiaire; ZM: Zone marginale; ZSV: Zone sous-ventriculaire; ZV: Zone ventriculaire.

## **Migration radiale et positionnement dans le cortex**

La migration radiale et le positionnement final des INs dans le cortex s'effectuent alors que les INs de la zone marginale se dirigent ventralement, ceux de la zone intermédiaire et ventriculaire migrent dorsalement vers la plaque corticale formant les couches profondes en premier (Ang et al., 2003). Le positionnement en couche est synchronisé de façon à ce que les INs et les neurones de projection qui sont générés au même moment, mais dans des zones différentes, adoptent la même position laminaire à la fin de la migration et du positionnement en couches corticales de ces deux types de neurones (Pla et al., 2006). Ainsi un IN et un neurone de projection généré à E12 se retrouveront dans les couches les plus profondes du cortex. Préalablement au positionnement des INs en couche, une étude d'imagerie par intervalles a montré que les INs atteignant la zone intermédiaire après leur phase de migration tangentielle se dirigeaient, d'abord, selon un mouvement saltatoire, vers la zone ventriculaire du cortex (Nadarajah et al., 2002). Cette première phase de migration radiale dirigée vers le ventricule suggère que les INs corticaux ont besoin des signaux provenant des cellules pyramidales, eux-mêmes obtenant les informations sur leur future position laminaire à partir de signaux de la zone ventriculaire (Nadarajah et al., 2002; McConnell et al., 1991). Le mouvement des INs de façon radiale dépend en partie des glies radiales qui projettent un prolongement vers la surface piale à partir de leur corps cellulaire situé près du ventricule. Une étude récente a montré que l'adhésion entre les neurites des INs et les prolongements des glies radiales, par l'intermédiaire des connexines 43 formant les jonctions GAP entre ces deux cellules, était nécessaire à la modification de la migration de tangentielle à radiale (Elias et al., 2010). Bien que les mécanismes reliés à la migration radiale des INs soient encore très peu connus, ceux-ci seraient influencés à la fois par des signaux environnementaux et intrinsèques (Pla et al., 2006; Nadarajah et al., 2002; Marin et al., 2015).

Les signaux environnementaux auxquels sont exposés les INs, à la fois ceux provenant du sous-pallium où les INs naissent, et ceux provenant du cortex où ils migreront, influencent la distribution laminaire des INs. Des expériences de transplantation ont effectivement décrit que des cellules progénitrices d'INs ayant effectué leur dernière division dans l'environnement du donneur et transplantées dans un cortex ne changeait pas

leur destination laminaire en fonction de l'âge de ce nouveau cortex (Pla et al., 2006). Cependant, des INs plus âgés transplantés dans un cortex plus jeune seraient confinés aux couches les plus profondes. Ceci indique que les INs auraient déjà une spécificité laminaire aussitôt la migration tangentielle amorcée, mais que l'environnement cortical influence aussi leur disposition finale (Pla et al., 2006). Au niveau intrinsèque, des facteurs de transcription tels que *Lhx6* et *Sox6* semblent essentiels au bon positionnement des INs GABAergiques corticaux. Leur perte mènerait à une accumulation d'INs dans la zone marginale et intermédiaire (Batista-Brito et al., 2010). Contrairement aux neurones pyramidaux nécessitant la voie de signalisation de la protéine Reeline pour leur bon positionnement laminaire, les INs corticaux n'en dépendraient pas directement. Cependant, en dictant le bon positionnement des neurones pyramidaux, la voie de signalisation de la Reeline influencerait le placement des INs qui dépend de celui des neurones pyramidaux (Pla et al., 2006).

### **Mécanismes cellulaires et moléculaires de migration des interneurones**

À partir du MGE jusqu'au cortex, le processus de migration tangentielle des INs comprend plusieurs phases de la locomotion cellulaire, incluant l'extension d'un neurite principal, la division de ce neurite en 2 ou plusieurs branches afin d'échantillonner l'environnement, la nucléokinèse (mouvement antérograde du noyau vers le centrosome), puis la rétraction du neurite caudal. La migration des INs implique des cycles successifs de chacune de ces étapes où le branchement des neurites principaux est couplé au mouvement saltatoire du corps cellulaire et à la rétraction subséquente du neurite caudal (Godin et al., 2012).

Ces mouvements dépendent essentiellement du remodelage continu du cytosquelette à chaque étape de la migration des INs. En périphéries des branches du neurite principal ainsi que dans la partie caudale du corps cellulaire, le cytosquelette est constitué principalement de F-actine et de myosine II. Au niveau le plus distal des neurites, le réseau d'actine permet la formation des protrusions, des lamellipodes qui permettent l'expansion du cône de croissance et l'avancement des INs en migration (Vallee et al., 2014; Valdeolmillos et Moya, 2013). La réorganisation du cytosquelette est hautement dépendante des protéines RhoGTPases et des protéines motrices (Valdeolmillos et Moya, 2013). La myosine II se lie aux filaments d'actine et peut induire leur contraction en réponse

à la phosphorylation de ses chaînes légères et lourdes. (Vicente-Manzanares et al., 2009). Au niveau du corps des neurites principaux, la présence importante de microtubules (MTs) permet la formation des branches en elles-mêmes et induit la stabilisation des protrusions au fur et à mesure de l'avancement du neurone (Lysko et al., 2014). Les différentes branches du neurite principal permettent, en réponse aux gradients de signaux chémoattracteurs, de réorienter la cellule vers la source du signal, et d'éviter ainsi les signaux chémorépulseurs (Trivedi et al., 2014; Marin et al., 2010). La capacité des INs à générer un neurite principal pouvant produire plusieurs branches et leur aptitude à pouvoir ensuite les rétracter est alors vitale à leur migration. En plus de permettre l'avancement et stabilisation des neurites, les MTs et les nombreuses protéines régulant leur organisation sont responsables du couplage entre l'avancement des neurites et la nucléokinèse, sans toutefois que ces deux processus ne soient totalement synchronisés (Godin et al., 2012; Tsai et Gleeson, 2005).

La nucléokinèse résulte à la fois des forces de traction exercées devant le noyau et des forces de propulsion exercées au niveau caudal (Martini et Valdeolmillos, 2010). Lorsque la branche la mieux orientée vers les signaux extracellulaires est stabilisée, le mouvement du noyau s'opère jusqu'à la bifurcation des branches du prolongement du neurite principal qui marque sa position finale à la fin de chaque nucléokinèse (Martini et al., 2009). La première étape consiste en l'avancement du centrosome à la bifurcation des branches du neurites principal. Il s'ensuit alors le déplacement de l'appareil de golgi dans ce renflement (Bellion et al., 2005). Au niveau du centrosome, le centre d'organisation des microtubules (MTOC) est à l'origine des MTs enveloppant le noyau en formant une structure en forme de cage. La translocation du soma vers le gonflement créé par le centrosome et les organelles survient lorsque la dynéine et la myosine II tirent le noyau le long des MTs et du cytosquelette d'actine, respectivement (Valdeolmillos et Moya, 2013; Martini et Valdeolmillos, 2010; Tsai et Gleeson 2005). Parallèlement, à l'arrière du noyau, la myosine II provoquera aussi une force de poussée, en détachant la cellule de ses substrats (Martini et Valdeolmillos, 2010).

Au fur et à mesure des cycles de nucléokinèse, la branche la moins stabilisée se rétracte et l'avancement du neurone forme un neurite caudal (Valdeolmillos et Moya, 2013). Les INs en migration tangentielle présentent souvent ce genre de neurites, bien qu'ils

soient généralement assez courts (Martini et al., 2009; Trivedi et Solecki, 2011). Leur rétraction dépendrait également de la contraction de la myosine II à l'arrière de la cellule (Evsyukova et al., 2014).

### **Développement des interneurons postnataux**

Plusieurs caractéristiques sont communes aux INs inhibiteurs corticaux. Contrairement aux neurones pyramidaux, ils ne projettent pas d'axones à l'extérieur du cortex et pour la plupart, ils ne présentent pas d'épines dendritiques et utilisent le GABA comme neurotransmetteur (Markram et al., 2004). Ils n'ont cependant pas que des points communs. Après les différentes phases de migration, les différents types d'INs inhibiteurs corticaux seront positionnés spécifiquement dans certaines couches corticales et formeront des colonnes fonctionnelles de pair avec les cellules excitatrices. Les INs exprimant PV, une protéine se liant au calcium, par exemple se retrouvent dans les couches II à VI. Ce type d'INs comprend deux types de cellules avec des propriétés morphologiques et électrophysiologiques différentes (Rudy et al., 2011). Les INs en panier PV-positifs innervent principalement le soma des cellules pyramidales, leur permettant de contrôler la synchronisation ainsi que la probabilité de décharge de celles-ci (Markram et al., 2004; Spruston, 2008). Ce type d'INs peut être subdivisé selon leur morphologie et comprend donc les cellules à petits et grands paniers et à panier-nid (Rossignol, 2011; Markram et al., 2004). Les cellules à grands paniers sont multipolaires avec une large arborisation dendritique ainsi qu'une arborisation axonale très développée connectant avec des neurones de couches supérieures et inférieures (Markram et al., 2004). Les cellules à petit panier peuvent être bipolaires, multipolaires ou à double bouquets et font des connexions interlaminaires grâce à leurs axones hautement branchés qui présentent aussi un grand nombre de varicosités (Markram et al., 2004). Les cellules à panier-nid auraient des axones plus longs et moins branchés, connectant les cellules pyramidales localement (Markram et al., 2004).

Les cellules en chandelier, PV-positives se trouvent dans les couches II à VI et excitent les cellules pyramidales, en ciblant le segment initial de l'axone où le potentiel du Cl<sup>-</sup> est inversé; leur rôle se situerait dans la génération et la modulation des potentiels d'action des cellules pyramidales (Thompson et Bannister, 2003; Rossignol, 2011).

Les INs exprimant la SST vont se retrouver dans les couches corticales II-VI et V et peuvent présenter différentes morphologies. Leurs principales connexions se situent dans la couche I où ils contactent les dendrites des cellules pyramidales (Rossignol, 2011). Ces contacts influencent les entrées synaptiques des cellules pyramidales, notamment, en limitant les potentiels d'action générés par les courants calciques (Markram et al., 2004). Dans la couche IV, les INs SST formeraient un circuit de désinhibition avec les INs PV qui régulent les neurones excitateurs recevant les informations sensorielles du thalamus (Scheyltjens et Arckens, 2016).

Les INs exprimant le peptide vasoactif de l'intestin (VIP) siègent surtout dans les couches II et III et innervent les cellules pyramidales et d'autres types d'INs faisant la liaison entre les différentes couches corticales (Rossignol, 2011). Plus particulièrement, les INs exprimant le VIP cibleraient les INs SST et participeraient au circuit de désinhibition des cellules pyramidales en exerçant un effet inhibiteur sur les INs SST (Neske et Connors, 2016).

### **Contribution des mécanismes développementaux aux encéphalopathies épileptogènes**

Les encéphalopathies épileptogènes (EE) sont un groupe de maladies neurodéveloppementales caractérisées par des crises d'épilepsie précoce pendant la maturation du cerveau causant des déficits cognitifs lors du développement (Depienne et al., 2012). Des données récentes suggèrent que certaines formes d'EE sont attribuables à un déséquilibre entre les niveaux d'excitation et d'inhibition au niveau cortical (Rossignol, 2011). Les spasmes infantiles sont des EE survenant chez les enfants en très bas âge et sont caractérisées par des spasmes, sous forme de contractions soudaines et brèves des muscles des membres et du tronc, en flexion ou en extension, survenant en salve lors des transitions du sommeil et accompagnée à l'électroencéphalogramme d'un tracé dit d'hypsarhythmie (Panayiotopoulos, 2005; Depienne et al., 2012). Les spasmes infantiles peuvent mener à des délais neurodéveloppementaux, à une déficience intellectuelle, à des troubles du spectre de l'autisme et évoluent parfois vers d'autres syndromes épileptiques avec crises réfractaires (Ex : Syndrome de Lennox-Gastaut) (Michaud et al., 2014). Les EE ont de multiples étiologies. Elles peuvent être causées par des lésions hypoxiques, des infections, des malformations ou être de cause génétique. Cependant, un grand nombre restent

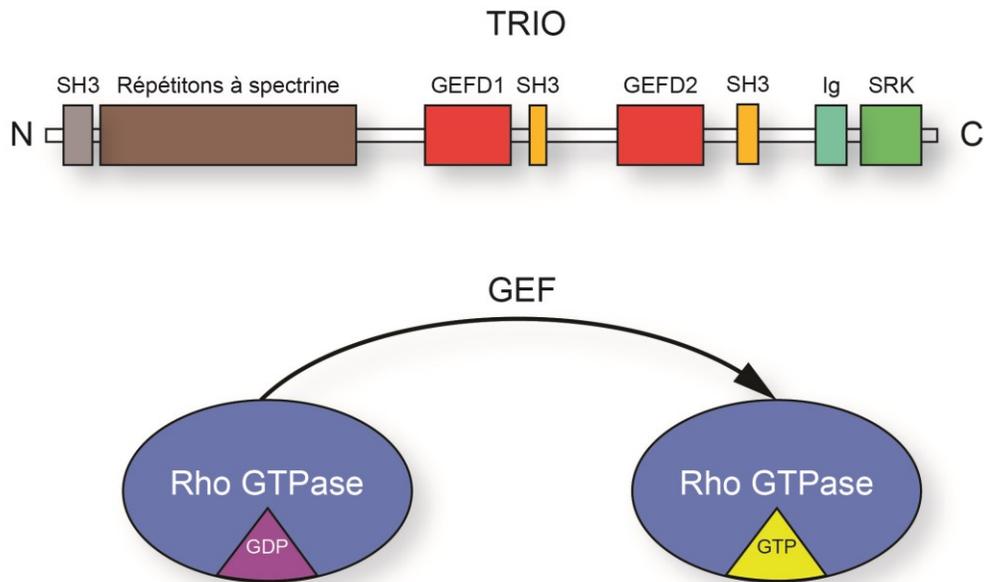
idiopathiques (Michaud et al., 2014). Certains gènes ont déjà été identifiés comme étant responsables de ces pathologies et plusieurs d'entre eux codent pour des canaux ioniques (Noh et al., 2012; Michaud et al., 2014). D'autres sont impliqués dans le développement cortical embryonnaire au niveau de la prolifération ou de la migration neuronale (Depienne et al., 2012). En effet, plusieurs études pointent les INs GABAergiques comme ayant un rôle prépondérant dans ces pathologies. La lissencéphalie, par exemple, est causé par des mutations dans les gènes *LISI* et *DCX* qui ont notamment pour fonction de réguler l'organisation des microtubules. Au niveau embryonnaire, il a été décrit qu'une perte de fonction du gène *LISI* menait à la fois à une migration radiale anormale et à des déficits dans la migration tangentielle des INs, alors qu'une perte de fonction de *DCX* altèrerait les processus de branchement et de nucléokinèse du noyau des INs (Reiner, 2013). Ces déficits entraînent une lamination aberrante, un cortex plus épais et sans circonvolution (Reiner, 2013). Au niveau fonctionnel, les souris présentant des mutations sur ces gènes développaient des crises épileptiques dues à une réponse inhibitrice altérée suite à la désorganisation dendritique des INs (Reiner, 2013; Kawabata et al., 2012). D'autres gènes comme *ARX* et le récepteur à la Neuregulin-1 ErbB4 impliqués dans la migration des INs sont aussi mis en cause dans les EE; leurs mutations entraînant une diminution du nombre d'INs atteignant le cortex (Carrascosa-Romero et De La Vega, 2016). Plusieurs auteurs suggèrent même qu'une faible perte d'INs dans le cortex rendrait plus vulnérables à développer des EE face à des lésions. Ceci s'expliquerait notamment par l'importance des entrées synaptiques inhibitrices des INs PV à panier sur les cellules pyramidales. Une faible perte d'INs résulterait alors en un déséquilibre entre l'excitation et l'inhibition corticale et une propension plus grande aux crises d'épilepsie (Carrascosa-Romero et De La Vega, 2016).

Afin de mieux comprendre les causes génétiques des spasmes infantiles le laboratoire du Dr Rossignol, en collaboration avec le laboratoire du Dr Michaud a effectué une étude par séquençage d'exome entier d'une large cohorte d'enfants présentant cette maladie (Michaud et al., 2014). Parmi les nouveaux gènes candidats identifiés, le séquençage d'exome entier a révélé deux mutations (hétérozygote composite) dans le gène *TRIO* chez un patient avec spasmes infantiles et déficience intellectuelle (Michaud et al., 2014).

## Structure et expression de *Trio* dans le système nerveux

La protéine traduite à partir du gène *TRIO* est formée de 3038 acides aminés dans sa forme la plus longue. Au niveau fonctionnel, elle se distingue par ses nombreux domaines enzymatiques. En effet, la protéine est formée de deux domaines Rho facteurs d'échange de nucléotide guanine (GEF) de spécificité distincte qui contiennent chacun un domaine catalytique homologue à Dbl (DH) et un domaine régulateur homologue à la pleckstrine (PH) (Schmidt et Debant, 2014). Ces deux domaines sont chacun associés à un motif SH3. À l'extrémité C terminale, la protéine contient aussi un domaine sérine thréonine kinase et un domaine immunoglobuline (Ig) tandis qu'à partir de l'extrémité N terminale, il y a un domaine Sec14 et plusieurs répétitions à spectrines (Schmidt et Debant, 2014).

*Trio* peut être épissé alternativement pour produire les isoformes A à E, chacune ayant une extrémité C-terminale différente. Ces isoformes ont des patrons et des niveaux d'expression variable dans le système nerveux central (Schmidt et Debant, 2014; Portales-Casamar et al., 2006). Bien que l'expression de la forme la plus longue de *Trio* soit ubiquitaire, son niveau d'expression n'est pas très élevé dans les différents tissus (Portales-Casamar et al., 2006). Au niveau cortical, chez la souris adulte, l'expression des isoformes A et D est prédominante. Leurs seules variations structurelles par rapport à l'isoforme longue se situent par l'absence du domaine sérine-thréonine kinase pour ces deux isoformes et par l'absence du domaine Ig sur l'isoforme A (Schmidt et Debant, 2014). L'isoforme C contenant seulement le premier domaine GEF est spécifique aux cellules de Purkinje du cervelet et est très peu exprimée dans le cortex (Schmidt et Debant, 2014; Portales-Casamar et al., 2006). Chez la souris, aucune étude n'a décrit la localisation précise de *Trio* à travers les régions du cortex et à travers les différentes populations de neurones. Chez le rat, par contre, une étude a montré que *Trio* est exprimé dans toutes les couches du cortex à la naissance. Après 14 jours de vie, moment correspondant au développement des synapses, il y a une forte expression dans les dendrites des cellules pyramidales de la couche 5 et une diminution de l'expression, bien que présente, dans les cellules des autres couches (Ma et al., 2005).



**Figure 2. Représentation schématique de la protéine TRIO, de ses multiples domaines et de l'activité des GEFs.** SH3 : Src homologie 3; SRK : Sérine/thréonine kinase

### Fonctions et régulation de *Trio*

Fonctionnellement, les différents domaines de *Trio* sont responsables de la régulation de plusieurs voies de signalisation menant à des effets biologiques multiples. Les domaines GEFs ont comme fonction d'accélérer l'échange entre le GDP et le GTP permettant l'activation des protéines Rho GTPases par leur liaison au GTP. Une fois liées au GTP, les protéines Rho GTPases peuvent se lier à leur effecteur et produire une réponse cellulaire.

Ainsi, le premier domaine GEF de *Trio* (GEFD1) participe à l'activation de Rac1, de RhoG et à la localisation de *Trio* au cytosquelette d'actine par la liaison du domaine PH à la Filamine A (Schmidt et Debant, 2014). Au niveau neuronal, plusieurs études ont décrit le rôle majeur de Rac1 dans le cycle cellulaire et dans les processus de motilité comme la nucléokinèse, la croissance et la guidance des neurites des INs provenant du MGE (Vidaki et al., 2011; Causeret et al., 2004; Briançon-Marjollet et al., 2008). En effet, Rac1 est indispensable pour la prolifération des progéniteurs des INs GABAergiques de la zone ventriculaire en régulant la transition de la phase G1 à S pendant le cycle cellulaire. Ce faisant, l'ablation de Rac1 pendant cette période mène à une réduction de 50% de la

population d'INs GABAergiques cortical chez la souris naissante (Vidaki et al., 2011). Cependant, Rac1 ne semble pas strictement nécessaire à la migration des INs postmitotiques (Vidaki et al., 2011). Avec *Trio*, Rac1 fait aussi partie de la voie de guidance neuronale de la nétrine-1 et du récepteur Deleted in colorectal cancer (DCC) (DeGeer et al., 2013; Briançon-Marjolet et al., 2008). Pendant le développement embryonnaire, la nétrine-1 est principalement localisée sur la route de migration des INs GABAergiques corticaux (Stanco et al., 2008). En condition normale, la voie de signalisation de DCC mène à la croissance axonale vers la source de nétrine-1 par l'activation de Rac1. Cependant, en l'absence de *Trio*, la guidance des axones en réponse à la nétrine-1 est affectée (Briançon-Marjolet et al., 2008). Ces effets sur la guidance et la croissance des neurites seraient principalement expliqués par les rôles de Rac1 dans la régulation du cytosquelette d'actine au cône de croissance et dans la stabilisation des microtubules pour la polarisation du neurone lors de la migration (Tivodar et al., 2014). En fait, la croissance des neurites médiée par *Trio* serait strictement dépendante de son domaine GEFD1. Celui-ci permettrait une activation encore plus spécifique de la protéine RhoG qui promeut à la fois la croissance des neurites via la voie de signalisation du facteur de croissance neuronal (NGF) et une rétroaction positive sur les autres Rho GTPases telles que Rac1 et Cdc42 (Blangy et al., 2000; Estrach et al., 2002; Govek et al., 2005). Le NGF régulerait positivement l'expression de *Trio* au niveau post-transcriptionnel menant à son enrichissement au cône de croissance comme le suggère une expérience avec des cellules PC12 (Estrach et al., 2002).

La régulation du domaine GEFD1 s'effectuerait en partie par des interactions entre les répétitions à spectrine, les domaines SH3 et d'autres protéines (Schmidt et Debant, 2014). Les répétitions à spectrine, par exemple, seraient responsables de l'auto-inhibition de *Trio* vis-à-vis l'activation de Rac1 (Chen et al., 2010). En se liant à ce domaine spécifique, des protéines comme DISC1 ou supervilline, qui sont impliquées dans le guidage axonal et la régulation de la myosine-II, respectivement, permettraient de lever l'effet d'auto-inhibition qu'exercent les répétitions à spectrine lors de leur liaison sur le domaine GEFD1 (Schmidt et Debant, 2014; Son et al., 2015). Il en résulte une plus grande quantité de Rac1 sous forme active (Son et al., 2015). Les domaines SH3 sont tout aussi importants, car ceux-ci contrôleraient l'activité enzymatique des domaines GEF par des

interactions intramoléculaires et intermoléculaires (Schiller et al., 2006). Ils seraient nécessaires à la croissance des neurites médiées par les domaines GEF et à l'autorégulation de la sérine/thréonine kinase (Schiller et al., 2006).

Le deuxième domaine GEF (GEFD2) active directement RhoA et celle-ci est connue comme ayant des effets antagonistes aux Rac GTPases (Estrach et al., 2002). Elle est nécessaire à la fois à la formation des fibres de stress d'actine, à la nucléokinèse, à la rétraction des neurites et à l'adhésion cellulaire (Bellanger et al., 1998; Causeret et al., 2004; Katamaya et al., 2011). En effet, la voie de signalisation de RhoA a été associée au contrôle dynamique du cytosquelette d'actomyosine. Cependant, contrairement à Rac1 qui mène à la croissance des neurites, RhoA stimule leur rétraction (Estrach et al., 2002). En aval de RhoA, la phosphorylation des chaînes légères de myosine II par la protéine associée au Rho kinase (ROCK) promeut la génération de forces de contraction du cytosquelette d'actine à l'arrière de la cellule (Peyre et al., 2015; Godin et al., 2012). Ces forces de contraction sont essentielles à la translocation du noyau des INs corticaux en migration. Une étude a montré qu'une réduction de l'activation de la myosine II menait à une diminution de la fréquence de translocation nucléaire des INs corticaux tout en diminuant la fréquence de division de leurs cônes de croissance (Bellion et al., 2005, Godin et al., 2012). Les études de délétions conditionnelles de RhoA ont montré son importance dans la prolifération des cellules progénitrices de la zone ventriculaire, notamment par le biais de son interaction avec les jonctions adhérentes de ces cellules (Katamaya et al., 2011). Cependant, dans les INs, RhoA serait nécessaire seulement pendant la différenciation des progéniteurs en INs (Katayama et al., 2013; Al-Jaberi et al., 2015). Lorsque les INs ont acquis la capacité de migrer, le rôle de RhoA serait indirect et sa délétion n'affecterait pas la proportion d'INs atteignant le cortex à partir du MGE (Katayama et al., 2013). En fait, pendant la migration des INs, RhoA serait fortement régulée négativement par plusieurs protéines comme p27 agissant comme des freins sur son activité pour permettre le réarrangement de la F-actine (Govek et al., 2012). Conséquemment, seul un faible niveau d'expression de RhoA serait nécessaire à la migration, ce qui amène un fin contrôle dans la rétraction des neurites et dans la nucléokinèse (Govek et al., 2012; Ota et al., 2014). *In vitro*, une partie de la régulation du domaine GEFD2 serait attribuable à sa partie PH2 qui inhibe l'activité catalytique du domaine DH2 (Bellanger et al., 2003).

Très peu d'études se sont intéressées aux rôles fonctionnels des domaines immunoglobuline et sérine/thréonine kinase de *Trio*. Il semble cependant que la séquence d'acides aminés de cette dernière soit presque identique à celle de la calmoduline kinase dépendante du calcium (Debant et al., 1996).

### **Rôles de *Trio* dans le développement du système nerveux**

Les études chez *C. elegans* et *D. melanogaster* ont dévoilé les rôles primordiaux de *Trio* dans le guidage des axones et dans la migration cellulaire, autant dans le système nerveux que dans le reste de l'organisme (Ma et al., 2005). Chez *C. elegans*, UNC-73, la protéine analogue à *Trio* est essentielle à la guidance et la croissance des cônes de croissance des axones en migration (Steven et al., 2005). Plus précisément chez *D. melanogaster*, *Trio* a été décrit comme étant un élément commun à la voie de signalisation responsable de la répulsion d'axones commissuraux en réponse à la nétrine-1 (Long et al., 2016). Sa délétion mène à une perte de la réponse répulsive provoquée par le récepteur UNC-5. Par ailleurs, *Trio* est aussi impliqué dans le développement des neurones sensoriels. Sa délétion affecte l'arborisation dendritique de ces neurones en réduisant le nombre de dendrites secondaires. Sa surexpression conduit à l'effet inverse, soit à augmenter le nombre de dendrites total et à limiter leur longueur (Shivalkar et Giniger, 2012).

Chez la souris, la fonction de *Trio* est indispensable au développement embryonnaire tardif, car les embryons *Trio*<sup>-/-</sup> meurent entre E15,5 et la naissance. En effet, *Trio* joue un rôle dans la formation des muscles squelettiques où, pendant la myogénèse secondaire, il participe dans la fusion des myoblastes formant les myofibres squelettiques (O'Brien et al., 2000; Charrasse et al., 2007). À ce stade, *Trio* est également impliqué dans la formation des couches cellulaires du gyrus denté et dans l'organisation des cellules mitrales des bulbes olfactifs (O'Brien et al., 2000). Les souris *Trio*<sup>-/-</sup> présentent un mauvais rassemblement et une lamination désordonnée des neurones de l'olive inférieure et du noyau moteur facial empêchant la formation des différents sous-noyaux, sans que le nombre de neurones ne soit affecté. Cet effet serait possiblement causé par la sous-activation de Rac1 chez les mutants *Trio*<sup>-/-</sup> (Backer et al., 2007). Dans les neurones hippocampiques, pendant la première semaine postnatale, un knock-down de *Trio* a pour conséquence d'augmenter le nombre de neurites primaires sans affecter la polarité axonale

(Ba et al., 2016). Au niveau synaptique, un knock-down de *Trio* réduit l'internalisation des récepteurs AMPA menant à une fréquence de décharge plus élevée de ces neurones (Ba et al., 2016). Du point de vue comportemental, la délétion conditionnelle de *Trio* dans le cortex cérébral et l'hippocampe mène à des troubles d'apprentissage spatial et de la mémoire tandis qu'au niveau anatomique, les souris ont de plus petits cerveaux (Zong et al., 2015).

À un tout autre niveau, la surexpression de *Trio* a été identifiée dans plusieurs cancers et serait impliquée dans la croissance tumorale invasive et la prolifération cellulaire rapide (Chattopadhyay et al., 2010; Zong et al., 2015). Les rôles de *Trio* dans le développement des neurones inhibiteurs demeurent néanmoins inconnus et son implication dans la pathophysiologie de l'épilepsie n'a jamais été étudiée.

### **Description phénotypique et génotypique des patients atteints de mutation de *TRIO***

Depuis l'étude du Dr Michaud, deux autres études ont été publiées dans lesquelles des patients avec des mutations sur le gène *TRIO* ont été identifiés (Ba et al., 2016; Pengelly et al., 2016). Les patients de ces deux cohortes présentaient des déficits cognitifs et comportementaux variés allant des retards psychomoteurs à des tableaux du spectre de l'autisme, avec déficience intellectuelle et microcéphalie (Ba et al., 2016; Pengelly et al., 2016). Dans la première cohorte, trois des quatre patients atteints de déficience intellectuelle et de retards développementaux présentaient des mutations non-sens hétérozygotes héritées par un parent tronquant la protéine TRIO aux acides aminés 217, 1251 et 1376. Chez le quatrième patient, la mutation était constituée d'une délétion intragénique partielle de 235 kilobases du gène (Ba et al., 2016). La présentation clinique des patients étudiés dans la seconde cohorte était plus sévère. Ceux-ci étaient en majorité atteints de déficience intellectuelle et de microcéphalie (Pengelly et al., 2016). Leurs mutations incluaient des modifications du cadre de lecture et des mutations faux-sens situées dans le domaine DH1. Le patient avec le phénotype le plus sévère de cette cohorte présentait de l'ataxie et était atteint de crises d'épilepsie nocturnes (Pengelly et al., 2016). Sa mutation était de type faux-sens *de novo* affectant une répétition à spectrine (Pengelly et al., 2016).

Les mutations identifiées dans le gène *TRIO* chez le patient suivi au CHU Sainte-Justine sont des mutations faux-sens, affectant des régions bien conservées du gène. Ces

mutations sont prédites pathogènes par les outils bio-informatiques (scores PolyphenV2 et SIFT) (Michaud et al., 2014). Plus précisément, les changements d'acides aminés sont E990G et G1787R. La première mutation se situe dans une répétition à spectrine alors que la deuxième se situe entre les domaines SH3 et GEFD2 de la protéine. La présence de deux mutations affectant chaque allèle du gène pourrait suggérer un mode de transmission récessif et une perte de fonction du gène. Comme l'imagerie par résonance magnétique du patient n'a révélé aucune malformation corticale, ceci suggère une migration intacte des cellules pyramidales. De plus, les crises épileptiques et les sérieux retards neurodéveloppementaux de l'enfant suggèrent des déficits majeurs au niveau cortical.

### **Hypothèse et objectifs**

De nombreuses études ont montré que *Trio* est impliqué de façon directe et indirecte dans les processus qui régissent la migration cellulaire, la croissance des neurites et la guidance axonale. Dans plusieurs organismes, *Trio* se situe en aval de la voie de signalisation de la nétrine-1, qui agit à la fois comme signal chémoattracteur et chémorépulsif et induit l'activation de Rac1. Rac1 est impliqué dans de nombreux processus soutenant la migration des INs, d'abord en permettant la prolifération cellulaire, puis la guidance des neurones vers la plaque corticale. Indirectement, *Trio* promeut également la croissance et la rétraction des neurites par l'activation des protéines RhoG et RhoA.

Étant donné les liens de *Trio* avec les protéines qui régule la migration cellulaire et qu'une corrélation entre des mutations sur ce gène et des déficits neurodéveloppementaux a déjà été décrite, nous postulons que la perte de fonction de *Trio* altère de façon significative la migration des INs vers le cortex et induit un déséquilibre entre l'excitation et l'inhibition corticale, résultant en une épilepsie et en des difficultés cognitives. Chez la souris, nous prédisons que la perte de fonction de *Trio* durant la période prénatale réduira la migration des INs du MGE vers le néocortex tout en modifiant la morphologie des INs en migration, ce qui pourrait entraîner subséquentement en des connexions synaptiques aberrantes.

## Objectifs.

1. Pour tester cette hypothèse, nous effectuerons une répression des ARNm de *Trio* par un petit ARN en épingle à cheveux (shARN) introduit chez la souris en période prénatale à E13.5, puis nous comparerons les effets de cette manipulation sur la morphologie et sur la migration des INs du MGE à ceux résultant de l'introduction d'un shARN non spécifique témoin.
2. Pour nous assurer de la spécificité du shARN, nous effectuerons une expérience sauvetage en surexprimant l'ADN codant (ADNc) de *Trio* résistant au shARN tout en injectant le shARN.

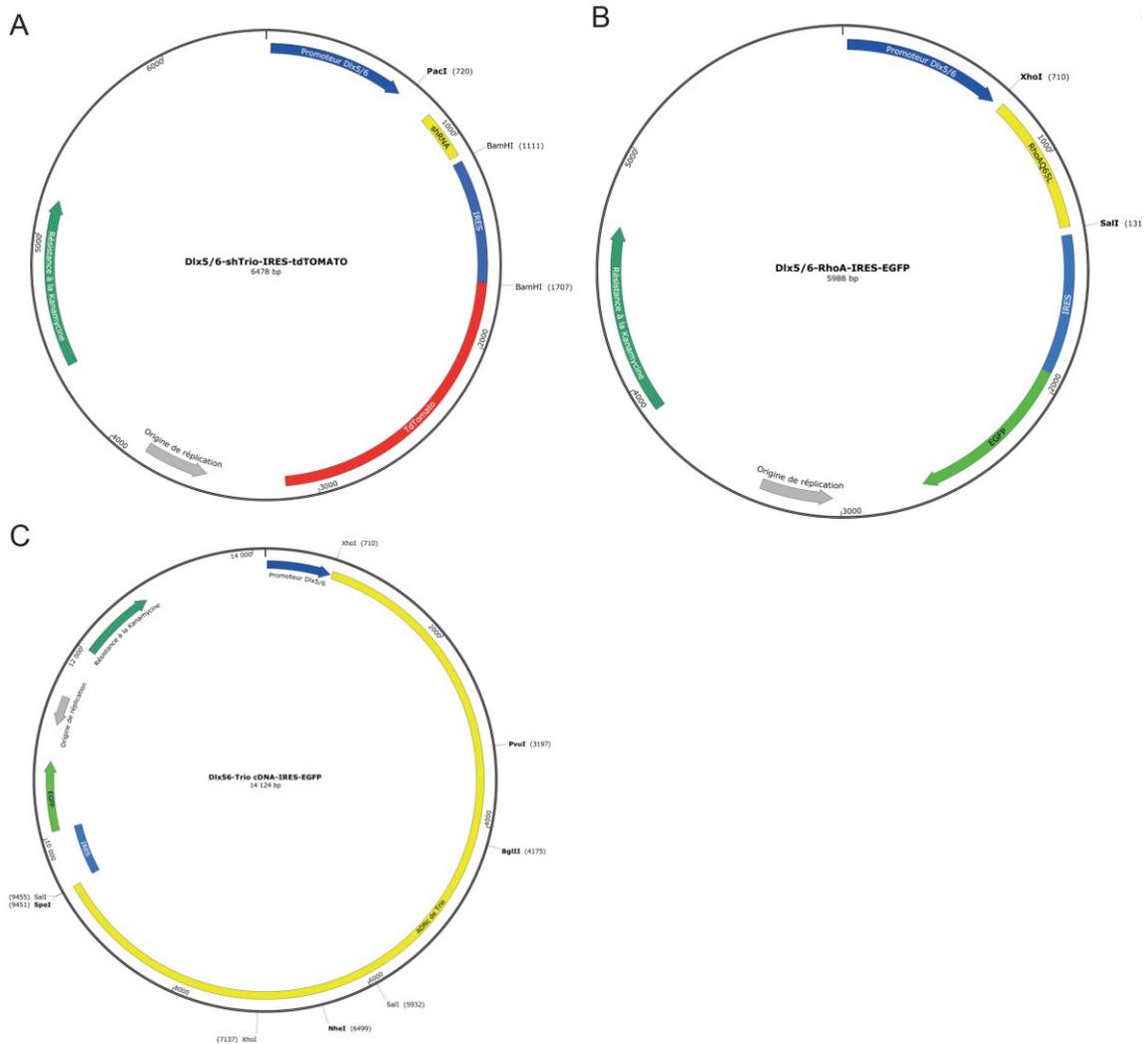
## **Matériel et méthodes**

Tous les protocoles ont été approuvés par le Comité institutionnel de bonnes pratiques animales en recherche du Centre hospitalier universitaire Sainte-Justine.

### **Construction du plasmide exprimant le shARN anti-*Trio***

Afin d'effectuer la répression ciblée de *Trio* dans les INs en développement, j'ai généré des plasmides exprimant un ARN interférant (shARN) sous le contrôle du promoteur *Dlx5/6*, sélectif aux INs. Les deux oligonucléotides du shARN anti-*Trio* ont été générés sur une base commerciale (Invitrogen) d'après un shARN déjà testé (Charrasse et al., 2007). Les deux brins du shARN ont été dilués à des concentrations de 1 µg/µl, puis hybridés dans du tampon d'hybridation (100 mM potassium et acétate, 30 mM Hepes à pH 7,5), à 95°C pendant 3 min, puis refroidis jusqu'à température pièce. La construction du plasmide shARN-*Trio* s'est effectuée à partir d'un plasmide déjà en usage dans le laboratoire Rossignol et exprimant un autre shARN sous le contrôle du promoteur *Dlx5/6* et suivi d'un gène rapporteur *tdTomato* et d'un gène de résistance à la kanamycine (*Dlx5/6-shSvil-IRES-tdTomato*). J'ai extrait le shARN anti-*Svil* et je l'ai remplacé par le shARN anti-*Trio* entre les sites de restriction de *Nhe1* et *Ase1*. Pour ce faire, 1µg d'ADN plasmidique a été mélangé avec 1 U/µl des enzymes de restriction *Nhe1* et *Ase1*, du FastDigest Green Buffer 1X dans de l'eau, puis incubé à 37°C durant 1 h. L'ADN plasmidique a été extrait du gel d'agarose 1% après électrophorèse, puis purifié par PCR Clean-up selon le protocole de Promega. L'ADN plasmidique purifié a été lié avec le shARN anti-*Trio* selon un rapport 1:3, avec 1 U/µl de ligase (T4 DNA Ligase, ThermoFisher) et du tampon de ligation 1X dans de l'eau à 16°C pendant une nuit. L'oligonucléotide inséré dans le plasmide est CGGGTGAAGCTATTGATACAGCtagtg aagccacagatgtaGCTGTATCAATAGCTTCACCCT. Les nucléotides en caractères gras correspondent aux nucléotides 3586-3604 de la séquence de l'ARNm de *Trio* chez la souris. La séquence en minuscule correspond à la boucle du shARN. Comme témoin, le shARN non spécifique ATCTCGCTTGGGCGAGAGTAAGtagtgaagccacagatgtaCTTACTCTCG CCCAAGCGAGAG (Open Biosystème) inséré dans le plasmide *Dlx5/6-IRES-tdTomato* a été utilisé. Les plasmides ont été transformés dans des bactéries *E. coli* 5-alpha Competent High Efficiency selon le protocole du New England BioLabs Inc. Les colonies de bactéries

extraites des plaques de sélection (1,6% agarose, 1% peptone, 0,5% yeast extract, 1% NaCl, 1µg/ml de kanamycine) sont mises dans 5 ml de milieu de culture (0,016% peptone, 1% yeast extract, 0,5% NaCl, 1µg/ml de kanamycine) et agitées pendant une nuit. L'ADN plasmidique des bactéries est purifié par Miniprep selon le protocole de Promega. Les plasmides sont testés par digestion de 1 µl d'ADN avec 1 U/µl d'enzymes de restriction PacI et BamHI, avec du FastDigest Green Buffer 1X dans de l'eau, puis par migration sur gel d'agarose 1%. La présence d'une bande à 391 paires de base confirme l'insertion du shARN anti-*Trio* dans le plasmide *Dlx5/6-IRES-tdTomato*. Les échantillons positifs sont envoyés pour séquençage à Génome Québec (McGill Innovation Center) et ceux avec la séquence attendue sont amplifiés selon le protocole de Maxiprep d'Invitrogen.



**Figure 3. Carte des plasmides codant pour le shARN anti-*Trio*, RhoA Q63L et l'ADNc de *Trio*.** Le shARN anti-*Trio* (A), le gène codant RhoA Q63L (B) et l'ADNc de *Trio* (C) ont été clonés dans des plasmides exprimant le promoteur *Dlx5/6*, le gène de résistance à la kanamycine et un gène rapporteur. IRES: Site interne d'entrée du ribosome.

### **Construction du plasmide exprimant l'ADN codant de *Trio***

Afin d'effectuer l'expérience de sauvetage du shARN et ainsi vérifier la spécificité du shARN utilisé, nous avons cloné l'ADN codant (ADNc) de *Trio* résistant au shARN dans le plasmide *Dlx5/6-IRES-EGFP*. Pour ce faire, nous avons amplifié le gène *Trio* (NCBI, NM\_001081302) à partir de l'ADNc provenant du cortex de souris au jour embryonnaire e15.5.

Le télencéphale de deux embryons de souris a d'abord été disséqué, puis à partir de 25 mg de ce tissu, l'ARN messager a été isolé avec le protocole de LS TRIzol Reagent (Life Technologies). Par la suite, nous avons fait une réaction de transcription inverse selon le protocole de SuperScript IV Reverse Transcriptase d'Invitrogen afin d'obtenir de l'ADNc. À partir d'ADNc de souris embryonnaire, nous avons amplifié par réaction de PCR le gène *Trio* avec la Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs). Étant donné la taille de l'ADNc de *Trio* (environ 10 000 paires de base), nous l'avons amplifié en 4 fragments partiellement redondants afin de profiter des différents sites de restriction pour les sous-cloner dans le plasmide *Dlx5/6-IRES-EGFP*.

Le premier fragment a été synthétisé en deux étapes. La séquence du gène contenant l'ATG et la région non traduite en 5' (5'UTR) étant riche en bases GC, il nous a été impossible de l'amplifier directement. Nous avons donc amplifié le début de l'ARNm, puis nous y avons ajouté la séquence codant l'ATG suite à une deuxième amplification. La première étape d'amplification a d'abord été de synthétiser la séquence des nucléotides 466 à 3046, à partir de 1 µg d'ADNc de souris. Ceci a été réalisé avec les amorces 5' GCCGCCAAGGACCTAGCCGACAT 3' et 5' CTGCTCAGCTGCCAAATC CAACTC 3' chacune à une concentration de 10 µM. La réaction de PCR est détaillée dans le tableau 1.

Une fois ce fragment amplifié, celui-ci a été sous-cloné dans le plasmide pGEM-T Easy afin de faciliter son utilisation subséquente. Le fragment codant la séquence des

nucléotides 466 à 3046 inséré dans le plasmide a alors servi de matrice et fut amplifié de nouveau en utilisant les amorces 5' ATCTCGAGTTAATTAACCCGGGCGGTGTCCTC GTCTATGT 3' et 5' CTGCTCAGCTGCCAAATCCAACCTC 3' pour obtenir la séquence manquante. Ceci a été fait selon les paramètres du Tableau 1 (Fragment 1.1). Par la suite, ce fragment a été cloné une deuxième fois dans le plasmide pGEM-T Easy.

Le deuxième fragment (nucléotides 1570 à 4350) a été amplifié avec les amorces sens: 5' ATCTCGAGCTCACCGCCTCCGCCAACTACTCC 3' et antisens: 5' TGTGAGG AAGGAAAGGGGGAGATCACTAGTCGACACT 3' (voir tableau 1).

Le troisième fragment (nucléotides 3971 à 6453) a été amplifié avec les amorces 5' ATCTCGAGTTAATTAACCCGCCAGGCATTGTCAACAAGGAGCTCAT 3' et 5' GTAATGACATGATGAACGTCGGGCGGCTGCACTAGTACT 3' (voir tableau 1).

Le quatrième fragment (nucléotides 6244 à 9664) a été amplifié avec l'amorce 5' ACTGCGATCGAGCGCCTGGGCCACAGACTGCAGCTC 3' et 5' agtgtcgactagtcaAA CTCTAGGCAGAAGCCTGCTCTGTAAGAAGTTTTTAATG 3' (voir tableau 1).

Pour rendre l'ADNc de *Trio* résistant au shARN, nous avons utilisé des amorces homologues comportant des mutations silencieuses (nucléotides en gras) au site de reconnaissance du shARN se situant au niveau du deuxième fragment. Pour ce faire, nous avons effectué deux réactions de PCR. La première avec les amorces 5' ATCTCGAGCTCACCGCCTCCGCCAACTACTCC 3' et 5' AGTTGAATTAATAATT TAACTCGCTCTTTGGTTTGCTTG 3', une température d'hybridation de 63°C et selon les mêmes paramètres qu'au Tableau 1. La deuxième réaction a été réalisée avec les amorces 5' CGAGTTAAATTATTAATTCAACTGGCCGATGGCTTTTG 3' et 5' TGT GAGGAAGGAAAGGGGGAGATCACTAGTCGACACT 3' à une température d'hybridation de 63°C. Par la suite, nous avons hybridé les deux fragments produits par ces réactions dans un tampon d'hybridation (100 mM potassium et acétate, 30 mM Hepes à pH 7,5), à 95°C pendant 3 min, puis refroidis jusqu'à température pièce. Avec ces fragments appariés, nous avons réalisé une dernière réaction de PCR selon les mêmes paramètres que celle utilisée pour le fragment 2 afin d'obtenir ce fragment résistant au shARN.

Suite à l'amplification des 4 séquences du gène *Trio* par PCR, une seconde réaction de PCR a été effectuée afin d'ajouter une queue poly-A à l'extrémité de chacun des fragments dans le but de pouvoir les sous-cloner dans le plasmide pGEM-T Easy. Cette

réaction a été réalisée avec le kit de Taq polymérase (ThermoFisher Scientific) en ajoutant 1 µg d'ADN produit par PCR et 1mM de désoxyadénosine triphosphate (dATP) lors d'un seul cycle d'élongation de 20 minutes à 72°C. Les produits ont ensuite été purifiés avec le protocole de purification de produit de PCR de Bio Basic (EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit). Enfin, les différentes séquences ont été liées dans le vecteur de clonage pGEM-T Easy (Promega) à 16°C pendant une nuit selon un rapport de ligation de 3 :1 (Fragment : Vecteur). Chacun des plasmides vecteurs contenant les séquences d'intérêts a été transformé dans des bactéries 5-alpha Competent *E. Coli* (New England Biolabs) puis sélectionné sur des plaques d'agar avec ampiciline 1 µg/mL, 0,5 mM d'IPTG et 80 µg/mL de X-Gal après une nuit d'incubation à 37°C. Les bactéries positives ont par la suite été inoculées dans 5 ml de milieu de culture (0,016% peptone, 1% yeast extract, 0,5% NaCl, 1µg/ml d'ampicilline) et agitées pendant une nuit. L'ADN plasmidique a été isolé selon le protocole de Bio Basic (EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps Kit), puis testé par digestion enzymatique. Pour s'assurer de l'absence de mutation pendant le processus de clonage, nous avons fait séquencer l'ensemble des fragments à Génome Québec (McGill Innovation Center). À cette fin, les amorces suivantes ont été utilisées : 5' GGAATACAACCATGAGGAGTG 3', 5' AGCCTTGGACGAGCGCAGCACCTT 3', 5' AGGTGCTGGACTGGATAGAG AAC 3', 5' ACAAAGCCCTGACCATGAATAACT 3', 5' TGGCCAGGAGGAACGCA GAC 3', 5' TGCCCGCAGGAAAGAGT 3', 5' GATACCTACCTGTGGGAAATGACC 3', 5' GGGAGGACGCCAACTTCAAGAT AAT 3', 5' GCCACCCCGCAGGATGAAAC 3', 5' TTTTATAGGAGAGTTGGAGAAG TGC 3', 5' ATCGAGTACCAGAGGAACCATAGT 3', 5' GTGAAGGCAGCAGCAGT AGCAACA 3', 5' CTGGAAGGGCCCCGAACACAAC 3', AGCTCAACACCACCTA CTACATCC 3'.

Une fois les 4 fragments de l'ADNc de *Trio* clonés dans un plasmide pGEM-T Easy, ceux-ci ont été assemblés successivement dans la plasmide *Dlx5/6-IRES-EGFP* grâce aux différents sites de restriction présents dans leur séquence. Sauf indication contraire, les digestions enzymatiques se sont déroulées à 37°C pendant 1 heure en utilisant 1 µg d'ADN plasmidique, 1 µL d'enzyme de restriction et du tampon FastDigest Green 1X. Une fois digérés, les différents fragments sont liés dans le plasmide selon un rapport de 3:1 en utilisant 5 U de ligase (T4 DNA Ligase, ThermoFisher Scientific), avec du tampon de

ligation 1X dans de l'eau à 16°C pendant une nuit. À chaque étape, les plasmides produits sont ensuite transformés dans des bactéries *E. coli* 10-bêta Competent High Efficiency selon le protocole du New England BioLabs Inc. Les colonies de bactéries extraites des plaques de sélection (1,6% agarose, 1% peptone, 0,5% yeast extract, 1% NaCl, 1µg/ml de kanamycine) sont mises dans 5 ml de milieu de culture (0,016% peptone, 1% yeast extract, 0,5% NaCl, 1µg/ml de kanamycine) et agitées pendant une nuit. L'ADN plasmidique des bactéries est purifié par Miniprep selon le protocole de Promega et testée par digestion enzymatique.

**Tableau 1. Paramètres des réactions de PCR ayant servi aux différents clonages et au génotypage**

Réaction de PCR (°C, min)	ADNc de <i>Trio</i>						Génotypage			
	Fragment 1	Fragment 1.1	Fragment 2	Fragment 3	Fragment 4	RhoAQ63L	CRE'	RCE''		
<b>Dénaturation</b>	95	95	95	95	95	95	95	94		
<b>initiale</b>	5	5	5	5	5	5	3	1		
35 cycles	<b>Dénaturation</b>	95	95	95	95	95	95	95	94	
	<b>Appariement</b>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	33' et 30" cycles	0,3	0,75
		60,5	60	63	61	61	58		56	59
	<b>Élongation</b>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		0,5	0,75
		72	72	72	72	72	72		72	72
<b>Élongation</b>	2	2	2	2	2	2	0,5		1	
	72	72	72	72	72	72	72	72		
<b>terminale</b>	5	5	5	5	5	5	10	5		

La première étape d'assemblage consistait à insérer le fragment 1 dans le plasmide *Dlx5/6-IRES-EGFP* en utilisant les sites de restrictions XhoI et Sall. Par la suite, une sous-étape a consisté à introduire le fragment 3 dans le plasmide pGEM-T Easy contenant le

fragment 2 en se servant des sites de restriction XhoI et BglII. Une fois ces fragments liés, ceux-ci ont été insérés dans le plasmide *Dlx5/6-IRES-EGFP* contenant le fragment 1 grâce aux sites PvuI et SpeI. Enfin, le fragment 4 a été intégré pour former le plasmide final en exploitant les sites NheI et SpeI.

### **Construction du plasmide *Dlx5/6-RhoAQ63L-IRES-EGFP***

Le clonage du plasmide exprimant la forme constitutivement active de RhoA (RhoA Q63L) s'est effectué à partir d'un plasmide disponible commercialement (Addgene, plasmid #12968). Le clone de RhoA provenant de souris n'étant pas disponible, nous avons choisi d'utiliser la forme humaine. Celle-ci est identique à 94% (NCBI, NM\_016802.5 et NM\_001664.3). Pour faciliter le clonage de RhoAQ63L dans le plasmide *Dlx5/6-IRES-EGFP*, nous avons inséré des sites de restriction dans sa séquence par PCR et à l'aide des amorces 5' TAACTCGAGTTAATTAAGCGGCCATGGCTGCAATCCGGAAGAAAC 3' et 5' TAAGTCGACATTCGAGTCACAAGACAAGGCAACC 3' suivant les paramètres décrits dans le Tableau 1. Suivant l'amplification, nous avons d'abord introduit l'ARNm de RhoAQ63L dans le plasmide pGEM-T Easy. Après avoir confirmé sa séquence par séquençage de Sanger à Génome Québec, nous avons pu insérer la séquence de RhoAQ63L dans le plasmide *Dlx5/6-IRES-EGFP* en utilisant les sites de restriction XhoI et SalI et suivant les mêmes étapes de clonage décrites précédemment.

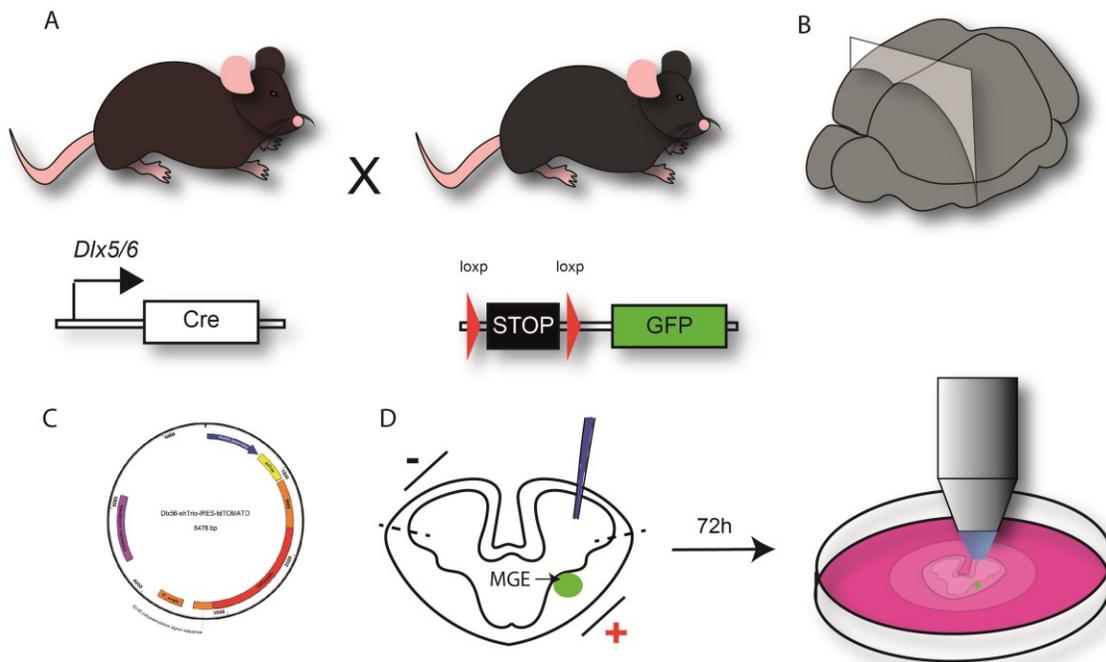
### **Génotypage des souris par PCR**

Dans le but d'établir le génotype des souris exprimant la EGFP sous le promoteur sélectif aux INs en développement, *Dlx5/6*, nous avons réalisé une réaction en chaîne par polymérase (PCR) avec l'ADN chromosomique des souris. L'ADN chromosomique a été extrait à partir d'un morceau de la queue des souris suivant le protocole de AccuStart II Mouse Genotyping Kit de Quanta Biosciences. Pour tester la présence de la Cre recombinase, les amorces 5' TAAAGATATCTCACGTA CTGACGGTG 3' et 5' TCTCTGACCAGAGTCATCCTTAGC 3' ont été utilisées suivant les paramètres présentés au Tableau 1. La présence de la Cre recombinase est détectée sous la forme d'une bande de 300 paires de base. Pour évaluer la présence de l'allèle RCE (ROSA-CAG-LoxP-STOP-LoxP-EGFP), permettant d'identifier les INs exprimant le Cre par expression d'une protéine fluorescente EGFP, nous avons effectué des réactions de PCR en utilisant les

amorces 5' CCCAAAGTCGCTCTGAGTTGTTATC 3', 5' GAAGGAGCGGGAGA AATGGATATG 3' et l'amorce 5' CCAGGCGGGCCATTTAC CGTAAG 3' (voir Tableau 1). L'allèle sauvage se caractérisait par la présence d'une bande de 550 paires de base tandis que l'allèle RCE par une bande d'environ 350 paires de base. L'ensemble des amorces a été utilisé à une concentration de 10  $\mu$ M.

### **Électroporation *ex vivo***

Afin d'exprimer les plasmides shARN expérimentaux et témoins dans les INs en migration, nous avons eu recours à l'électroporation *ex vivo* suivi de cultures de tranches corticales organotypiques. Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale à 13,5. Nous établissons que les embryons sont à E0.5 lorsqu'un bouchon vaginal est observable chez la mère. Les trompes utérines sont extraites et mises dans du PBS 1X à 4°C. À partir d'un croisement *Dlx5/6<sup>Cre-</sup>; RCE<sup>EGFP</sup>* qui permet de libeller tous les INs en développement, nous sélectionnons les embryons exprimant la EGFP au sein du MGE, à l'aide d'une lampe UV. Les embryons sont décapités, la tête est mise dans un tampon d'électroporation (0,7 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM Hepes, 137 mM NaCl, 5mM KCL et 6 mM D-Glucose) et nous injectons 3,5  $\mu$ g d'ADN dans un ventricule. Ensuite, nous appliquons un courant électrique de 4 impulsions de 50 ms à 50 V, séparées de 250 ms en orientant les électrodes d'électroporation selon un angle favorisant l'introduction du plasmide dans le MGE. Le cerveau est mis dans un moule contenant de l'agarose 4% ayant une température de fusion de 40°C. L'agarose est refroidi pour solidification, puis taillé en blocs. Les cerveaux dans l'agarose sont placés dans du fluide cérébrospinal artificiel (87 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 mM NaHCO<sub>2</sub>, 75 mM sucrose et 20 mM glucose) à 4°C et coupés au vibratome (Leica VT1000S) de façon à faire des tranches de 250  $\mu$ m avec une fréquence de 8 Hz et une vitesse de 350  $\mu$ m/s. Seulement les tranches où apparaissent le MGE et l'ADN électroporé avec le colorant sont sélectionnées. L'ADN est préparé à 4  $\mu$ g/ $\mu$ l avec du Green Buffer 1X pour pouvoir la visualiser. Les tranches sont placées sur membrane de polycarbonate semi-perméable (Whatman Nuclepore Track-Etch Membrane), puis mises en culture sur du milieu neurobasal 250 ml avec 4,5 ml de B27, 2,5 ml de glutamine 200 mM, 12,5 ml de horse sérum et enrichi de 2,5 ml de N2 100X à 37°C pendant 72 h.



**Figure 4. Représentation schématique de l'électroporation *ex vivo*.** Le plasmide exprimant le shARN spécifique à *Trio* et le gène rapporteur *tdTomato* sous le contrôle du promoteur *Dlx5/6* (C) a été injecté dans le ventricule latéral d'une souris *Dlx5/6-RCE<sup>+/+</sup>* et électroporé dans le MGE (A, B, D). 72h après l'électroporation, la morphologie des neurones est analysée par microscopie confocale (D).

### Immunohistochimie sur des tranches en culture organotypique

Les tranches sur membrane sont fixées avec 4% de paraformaldéhyde (PFA) pendant toute la nuit à 4°C. La PFA et le milieu de culture sont retirés et les tranches sont lavées 3 fois 10 minutes dans du PBS. Les tranches de chaque cerveau sont séparées des membranes et mises en commun dans un même puits d'une plaque à 24 puits. Deux cents microlitres d'une solution de 30% de sucrose dans du PBS sont ajoutés à chaque puits afin d'offrir une cryoprotection. Les plaques sont couvertes pour éviter l'exposition à la lumière et mises à agitation pendant 10 min. Les tranches sont congelées à -20°C, puis décongelées à température pièce pour favoriser la pénétration des anticorps. La solution de sucrose est enlevée et les tranches sont lavées 3 fois avec du PBS pendant 10 min. Trois cents microlitres d'une solution de blocage (10% de sérum normal de chèvre (NGS), 1% triton, dans du PBS) sont ajoutés dans chaque puits pour le blocage des tissus, puis les tranches

sont agitées pendant 2 h à température pièce. La solution de blocage est retirée et les tranches sont exposées aux anticorps primaires rat anti-EGFP (Millipore lot.1991263), souris anti-NeuN (Lifetechnology lot.1669112), lapin anti-mCherry (Clontech lot.1306037), 1:1000, NGS 5%, triton 0,1%, dans du PBS à raison de 200µl de solution par puits et placées pour agitation à 4°C pendant une nuit. Trois lavages au PBS pendant 10 min sont effectués le lendemain. Les tranches sont ensuite exposées aux anticorps secondaires chèvre anti-rat (Alexa 488), chèvre anti-lapin (Alexa 594) et chèvre anti-souris (Alexa 647), 1:1000 dans du NGS 5%, triton 0,1%, dans du PBS (200 µl de solution par puits) et mises à agitation pendant 2 h à température pièce. Les tranches sont lavées 3 fois avec du PBS pendant 10 min, puis montées sur des lames de microscopie, couvertes avec du Fluoromount-G (SouthernBiotech) et une lamelle de verre, puis scellées avec du vernis.

### **Perfusion et coupe de cerveaux**

Pour obtenir des tranches de cerveaux embryonnaires de souris sauvages, nous avons sacrifié la mère par dislocation cervicale, puis disséqué les cerveaux de ses embryons. Les cerveaux de souris adultes à P21 ont été obtenus suite à leur anesthésie avec 0,3 ml de pentobarbital intrapéritonéale. Une perfusion intracardiaque de 12 ml de PFA 4% a ensuite été effectuée. Les cerveaux embryonnaires et adultes extraits sont fixés pendant 30 minutes et 1 h, respectivement, dans une solution de PFA 4% à 4°C. Ils sont ensuite transférés dans du PBS 1X avec 30% de sucrose pendant 24 h, puis congelés dans des moules avec du Cryomatrix (ThermoFisher Scientific) à -80°C. Les cerveaux embryonnaires sont tranchés au cryostat avec une épaisseur de 25 µm et les cerveaux adultes à une épaisseur de 18 µm et sont recueillis sur des lames de microscopie et congelés à -20°C.

### **Immunohistochimie sur coupes au cryostat**

Les tranches de cerveaux sur lames sont décongelées à température pièce pendant 30 minutes. Les manipulations sont ensuite effectuées à l'abri de la lumière. Du PapPen est appliqué sur la bordure de la lame et laissé à sécher pour 15 minutes. Un premier lavage de 5 min au PBS 1X est effectué. Par la suite, 500 µL d'une solution de blocage (10% NGS, 1% Triton dans PBS) est ajouté à température pièce pendant 2h. La solution de blocage est retirée, puis la solution contenant l'anticorps primaire est ajoutée (5% NGS,

0,3% Triton) pendant une nuit à 4°C. Les anticorps primaires utilisés sont lapin anti-*Trio* 1 :250 (SantaCruz Biotechnology), souris anti-NeuN 1 :1000, rat anti-EGFP 1 :1000, rat anti-SST 1 :100 (Millipore lot. MAB354) et souris anti-PV 1 :1000 (Sigma-Aldrich lot. 091M4792). Ensuite, les lames sont lavées 3 fois au PBS 1X pendant 10 minutes et la solution d'anticorps secondaires (5% NGS, 0,3% Triton) est ajoutée et incubée 2h à température pièce. Les anticorps secondaires que nous avons utilisés sont anti-souris Alexa 647, anti-rat Alexa 488 et anti-lapin Alexa 594 tous à une concentration de 1 :1000 (Invitrogen). Trois derniers lavages dans le PBS 1X sont réalisés pendant 10 min, puis du Fluoromount-G est déposé sur la lame et celle-ci est recouverte d'une lamelle et scellée avec du vernis.

### **Microscopie confocale**

Les tranches entières sont imagées par microscopie confocale (Leica SP8) avec un objectif de 20X afin d'obtenir un montage d'image à des intervalles de 5 µm. Les cellules individuelles sont imagées avec un objectif de 63X à des intervalles de 0,5 µm. Le logiciel LASX (Leica) est utilisé pour obtenir ces images qui peuvent ensuite être exportées pour analyse. Les cellules sont reconstruites à l'aide du logiciel NeuroLucida permettant une reconstruction 3D. Nous analysons les variables suivantes: l'aire du corps cellulaire, la longueur du neurite rostral et du neurite caudal, le nombre de branches des divers neurites ainsi que la distribution des dendrites selon la distance par rapport au corps cellulaire (analyse de Sholl). Le nombre de cellules dans le cortex et dans le MGE est quantifié à l'aide du logiciel ImageJ.

### **Analyse statistique**

J'ai obtenu des images en 63X de 37 cellules tirées de 4 cerveaux traités avec le shARN anti-*Trio*, de 40 cellules de 12 cerveaux traités avec le shARN témoin, 13 cellules tirées de 1 cerveau traité avec l'ADNc de *Trio* et 5 cellules tirées de 1 cerveau traité avec RhoAQ63L. L'analyse de la migration des INs s'est faite à partir de 3 cerveaux traités avec le shARN anti-*Trio*, 3 cerveaux traités avec le shARN témoin et 1 cerveau avec l'expérience de sauvetage avec soit l'ADNc de *Trio* ou RhoAQ63L. Tous les résultats sont présentés avec ± l'erreur standard moyenne et l'analyse statistique des résultats a été effectuée avec le logiciel Excel. Des tests d'analyse de variance (ANOVA) suivi de tests de Tuckey ont

été utilisés pour analyser les différences de moyenne entre les paramètres des 4 groupes (sh*Trio*, shARN témoin, ADNc, RhoAQ63L) et un test de Kolmogorov-Smirnov a été réalisé pour évaluer les différences de distribution dans l'analyse de Sholl.

## **Résultats**

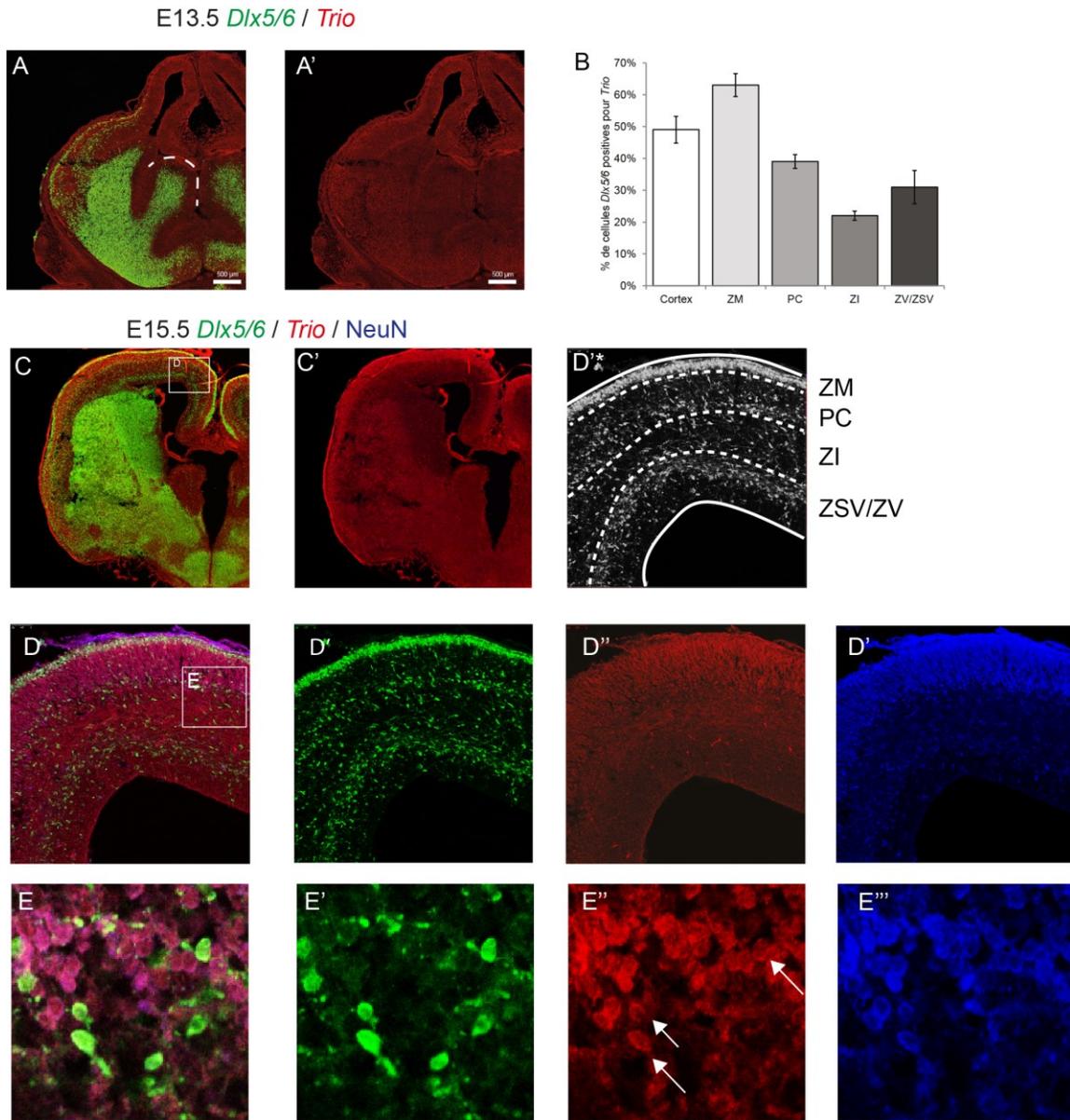
### **Localisation de TRIO dans les INs GABAergiques corticaux prénataux**

Avant d'étudier le rôle fonctionnel de TRIO dans la migration des INs, nous avons procédé par immunohistochimie afin d'évaluer la présence de la protéine dans les INs GABAergiques corticaux prénataux à différents stades de la migration. L'observation des INs aux stades les plus précoces, soit à partir de E13.5 (Figure 5. A) montre que TRIO n'est que très peu présent dans les INs au niveau du MGE à ce stade (Figure 5. A, zone pointillée). Cependant, dès la sortie du MGE, on peut observer que TRIO est exprimé dans les INs qui débutent leur migration.

Aux stades intermédiaires de la migration, à environ E15.5, nous avons également observé une localisation variable de TRIO dans les INs (Figure 5 D). Afin de distinguer de possibles différences dans les voies de migration empruntées par les INs exprimant TRIO, nous avons quantifié le nombre d'INs (*Dlx5/6* positif) qui colocalisaient avec TRIO dans les différentes sous-régions du cortex en développement (Figure 5. D\*, E). À E15.5, lorsque la migration est en cours, ce sont principalement les INs empruntant la ZM qui vont exprimer TRIO.  $63 \pm 3\%$  des INs passant par la ZM pour se positionner dans le cortex vont l'exprimer tandis que ce nombre est réduit à  $39 \pm 3$ ,  $22 \pm 1$  et  $31 \pm 5\%$  pour la PC, la ZI ainsi que les ZV et ZSV, respectivement (Figure 5. B). Au total, 49% des INs migrant vers le cortex expriment TRIO à ce stade.

### **La répression de *Trio* altère la morphologie des INs GABAergiques en migration**

Après avoir confirmé que *Trio* est exprimé par les INs GABAergiques corticaux en migration, nous avons voulu étudier les conséquences d'une répression de l'ARNm de *Trio* dans les INs en migration (Figure 6 et 7). Pour réaliser cet objectif, nous avons eu recours à l'électroporation *ex vivo* de cerveaux embryonnaires à E13.5. Nous avons donc électroporé un plasmide contenant un shARN exprimé sous le promoteur *Dlx5/6* dans le MGE (Figure 6A et 7A). La même manipulation a été effectuée avec un shARN non spécifique (Figure 6B et 7B). Nous avons d'abord évalué la migration nette en examinant la proportion d'INs atteignant le cortex après 72h de migration (Figure 6. E). Chez les INs subissant la répression de *Trio*, cette proportion ( $5,7 \pm 1,5\%$ ) était significativement différente du groupe témoin ( $14,6 \pm 2,6\%$ ,  $p = 0,03$ ) (Figure 6. E).

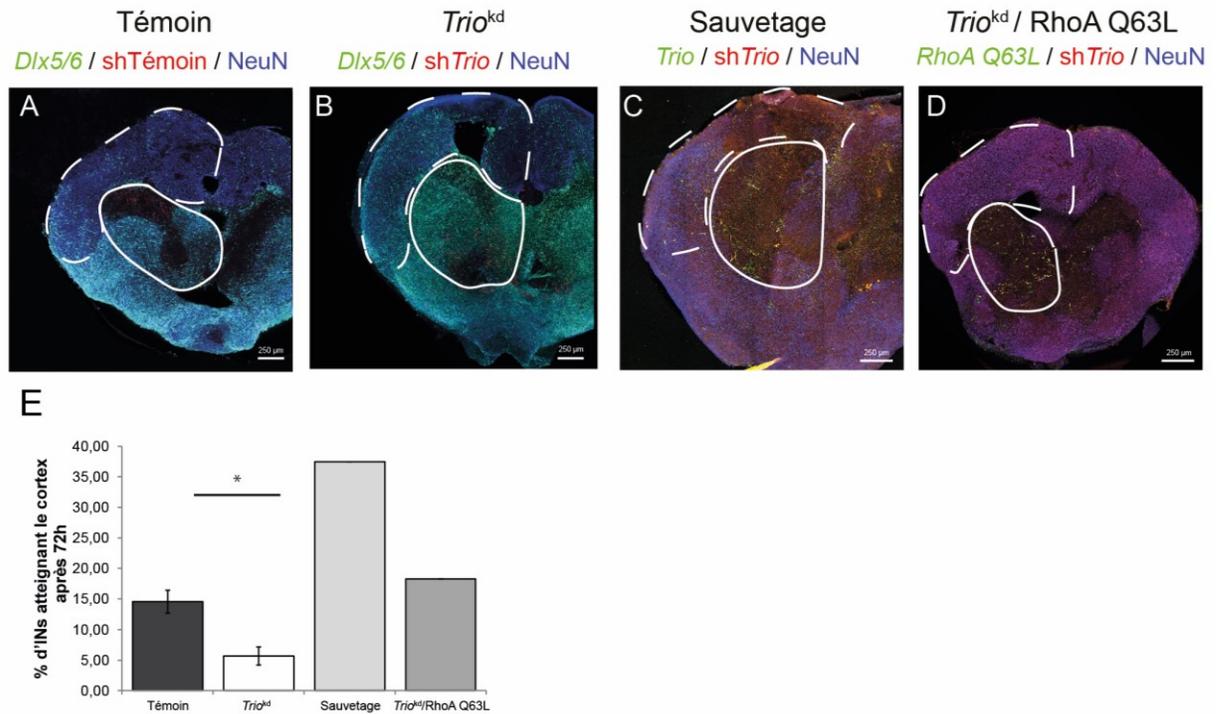


**Figure 5. Localisation de la protéine TRIO dans les INs GABAergiques corticaux.** Des tranches de cerveaux aux jours embryonnaires 13.5 (A) et 15.5 (C) ont été traitées par immunohistochimie avec les anticorps anti-EGFP, TRIO et NeuN (E', E'', E'''), puis les cellules *Dlx5/6* exprimant la protéine TRIO ont été quantifiées dans les différentes sous régions corticales (B, D'\*) (3 cerveaux, 2908 cellules). ZM: Zone marginale, PC: Plaque corticale, ZI: Zone intermédiaire, ZV: Zone ventriculaire, ZSV: Zone sous-ventriculaire. Les flèches indiquent les INs *Dlx5/6* positifs pour TRIO. Les données sont présentées  $\pm$  l'erreur standard moyenne.

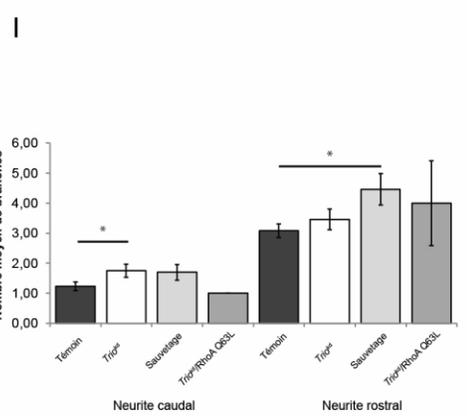
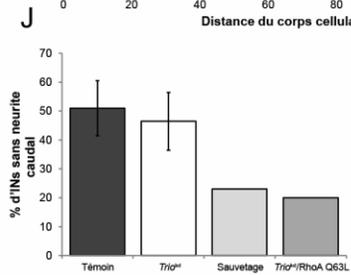
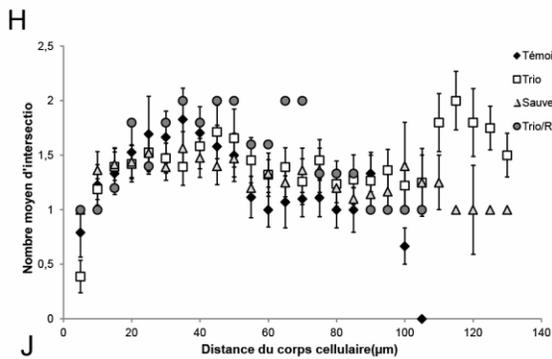
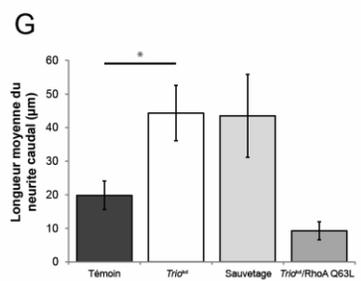
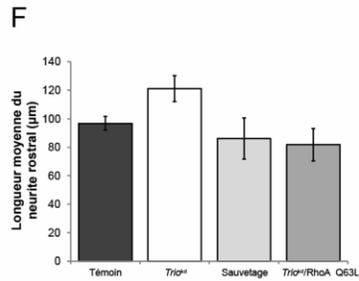
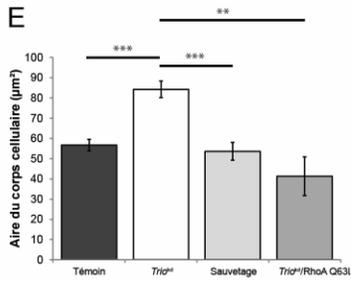
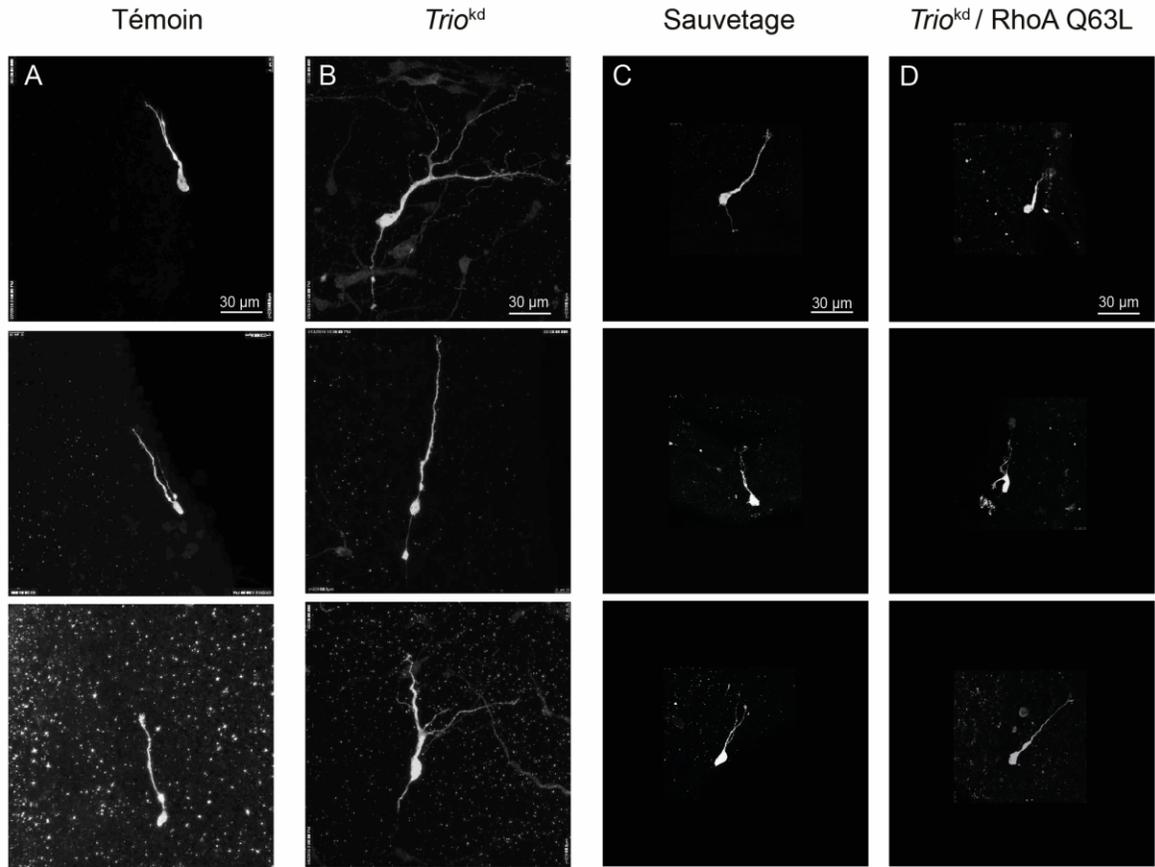
Pour mieux comprendre comment la répression de *Trio* réduit la migration des INs vers le cortex, nous avons analysé la morphologie des INs atteignant le cortex à E16.5 (72h après la transfection). L'étude des INs individuels migrant dans le cortex, et exprimant le shARN anti-*Trio* a révélé des changements morphologiques importants. D'abord, les corps cellulaires des cellules dans lesquelles *Trio* est réprimé, présentaient une aire plus élevée (moyenne de  $84,27 \pm 4,12 \mu\text{m}^2$ ) en comparaison à ceux des cellules témoins (moyenne de  $56,68 \pm 2,81 \mu\text{m}^2$ ) (Figure 7. E). Ce résultat est significatif avec  $p = 4 \times 10^{-7}$ . Nous avons également remarqué que les neurites rostraux des cellules exprimant le shARN anti-*Trio* ( $121,04 \pm 9,13 \mu\text{m}$ ) étaient plus longs que les témoins ( $96,81 \pm 4,79 \mu\text{m}$ ), sans que la différence ne soit significative ( $p = 0,09$ ) (Figure 7. F). Seuls les neurites caudaux des cellules, dans lesquelles *Trio* est réprimé, étaient significativement plus longs ( $44,32 \pm 8,23 \mu\text{m}$ ), que ceux des cellules témoins ( $19,82 \pm 4,32 \mu\text{m}$ ) ( $p = 0,01$ ) (Figure 7. G). Il faut aussi noter que 46 % des INs mutés présentaient une morphologie sans neurite caudal comparativement à 51% chez les INs témoins (différence non significative) (Figure 7. J). Parmi les INs présentant un neurite caudal, les cellules exprimant le plasmide *Dlx5/6-shTrio-IRES-tdTomato* produisaient significativement plus de branches sur leur neurite caudal ( $1,75 \pm 0,22$ ) que les cellules témoins ( $1,23 \pm 0,15$ ) ( $p = 0,03$ ) (Figure 7. I). Néanmoins, aucune différence dans le nombre de branches sur le neurite rostral n'a pu être décelé entre les INs réprimés pour *Trio* et les INs témoins ( $3,46 \pm 0,35$ ;  $3,08 \pm 0,23$ , respectivement) ( $p = 0,4$ ) (Figure 7. I). Finalement, nous avons procédé à une analyse de Sholl pour analyser la distribution des branches le long du neurite rostral selon leur distance par rapport au corps cellulaires (Figure 7. H). Celle-ci a montré que les INs mutés présentent une arborisation significativement moins complexe au niveau proximal, mais qu'au niveau distal, ceux-ci possèdent significativement plus de branches ( $p < 0,05$ ) (Figure 7. H).

Suite aux expériences avec le shARN, nous avons voulu vérifier sa spécificité en réalisant une expérience de sauvetage avec l'ADNc de *Trio*. Cette manipulation consistait à réprimer l'ARNm endogène de *Trio* tout en surexprimant son ADNc que nous avons cloné et rendu insensible au shARN. L'analyse des résultats a montré que le sauvetage du phénotype était incomplet. En effet, plus d'INs migraient vers le cortex comparativement aux témoins lors de la surexpression de *Trio* (37,5% et 14,6%) (Figure 6. E). L'expression

de l'ADNc résistant a également corrigé certains aspects morphologiques puisqu'aucunes différences dans l'aire du corps cellulaire, la longueur du neurite rostral ainsi que dans le nombre de branches du neurite caudal et dans l'analyse de Scholl n'ont été observées entre les INs de l'expérience sauvetage et les INs témoin (Figure 7. E, F, I, H). Cependant, les INs analysés lors de l'expérience sauvetage présentaient plus souvent un neurite caudal (74%) (Figure 7. J) et celui-ci était également plus long ( $43,5 \pm 12,4 \mu\text{m}$ ) (Figure 7. G) que ceux des témoins. Leurs neurites rostraux possédaient aussi plus de branches ( $4,5 \pm 0,5$ ) que les témoins (Figure 7. I).



**Figure 6. La répression de *Trio* dans les INs GABAergiques en développement mène à une réduction de leur migration.** Le pourcentage d'INs atteignant la plaque corticale (ligne pointillée) 72h après électroporation avec un shARN témoin (A), un shARN spécifique contre *Trio* (B), lors d'un sauvetage avec l'ADNc de *Trio* (C) ou lors d'un sauvetage avec RhoAQ63L (D) a été calculé (E). (Témoin: 1 cerveau, *Trio*<sup>kd</sup>: 3 cerveaux, Sauvetage: 1 cerveau, RhoAQ63L: 1 cerveau). Les données sont présentées  $\pm$  l'erreur standard moyenne.



**Figure 7. La répression de *Trio* dans les INs corticaux en migration mène à des altérations morphologiques.** Reconstruction de la morphologie des INs traités avec le shARN témoin (A), le shARN anti-*Trio* (B), le sauvetage de *Trio* (C) ou avec la forme constitutivement active de RhoA (D) (Témoin: 43 cellules, *Trio*<sup>kd</sup>: 43 cellules, Sauvetage: 13 cellules, RhoAQ63L: 4 cellules). La quantification de l'aire du corps cellulaire (E), de la longueur moyenne du neurite rostral (F), de la longueur moyenne du neurite caudal (G), du pourcentage d'INs présentant un neurite caudal (J) et du nombre moyen de branches a été effectuée (I) et comparé avec les INs témoin. Une analyse de Scholl a été réalisée sur le neurite rostral (H). L'analyse statistique a été effectuée en utilisant des ANOVA suivi de tests de Tuckey (E, F, G, I, J) ou un test de Kolmogorov-Smirnov (H). Toutes les données sont présentées  $\pm$  l'erreur standard moyenne.

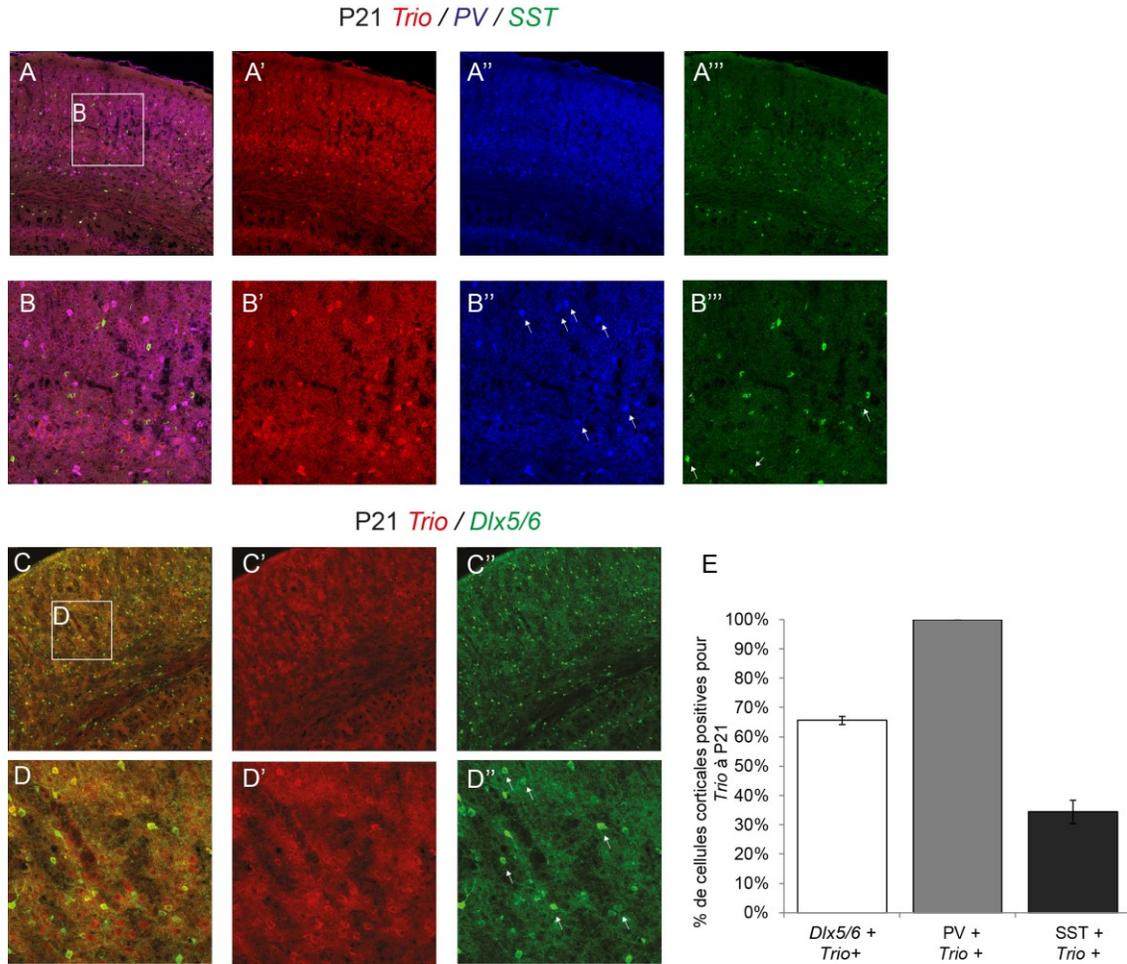
### **La forme constitutivement active de RhoA corrige partiellement la perte de fonction de *Trio***

Ensuite, nous avons voulu établir si la voie de signalisation de RhoA était responsable des défauts dans la migration et des altérations morphologiques des INs suite à la répression de *Trio*. Nous avons donc élaboré une deuxième expérience sauvetage dans laquelle nous avons exprimé une forme constitutivement active de RhoA (RhoAQ63L), dans le plasmide *Dlx5/6-IRES-tdTomato*, dans le but de compenser sa sous-activation résultant de la répression de *Trio* par le shARN. Dans la majorité des paramètres analysés, aucune différence significative n'a été notée entre la morphologie des INs témoin et les INs de l'expérience sauvetage exprimant le shARN anti-*Trio* et RhoAQ63L (Figure 7. E-J). Cependant, les INs exprimant RhoA Q63L semblaient produire moins souvent un neurite caudal comparativement aux témoins (Figure 7. J).

### **TRIO localise dans les INs GABAergiques corticaux matures**

Finalement, nous avons conduit une expérience d'immunohistochimie sur des tranches de cerveaux adultes à P21, dans le but de déterminer si TRIO était spécifique à un certain type d'INs après la période de développement précoce (Figure 8). Nos résultats montrent que TRIO est localisé dans  $66 \pm 1$  % des INs *Dlx5/6* positifs et dans l'ensemble

des INs PV positifs (100%) (Figures 8. C, B'', E). Dans une moindre mesure, TRIO localise dans 34% des INs SST-positifs (Figure 8. B''', E).



**Figure 8. Localisation de TRIO dans les INs GABAergiques corticaux matures.**

Des tranches de cerveaux provenant de souris sauvage *Dlx5/6<sup>Cre</sup>;RCE<sup>EGFP</sup>* au jour postnatal 21 ont été traitées par immunohistochimie avec les anticorps anti-EGFP, SST, PV et TRIO (A-D). La quantification du nombre de cellules positives pour *Dlx5/6*, PV et SST et colocalisant avec TRIO a été effectué (E) (n=3 cerveaux, 2002, 996 et 764 cellules, respectivement). Les données sont présentées ± l'erreur standard moyenne.

## **Discussion**

Le but de cette étude était d'explorer le rôle de *Trio* dans la migration des INs GABAergiques corticaux en période prénatale. Pour ce faire, nous avons utilisé un shARN anti-*Trio* exprimé sous le contrôle du promoteur *Dlx5/6* afin de réprimer spécifiquement l'expression de *Trio* dans les INs GABAergiques corticaux au début de leur migration. Sur la base de résultats de Vidaki et al., nous pensons que la répression de *Trio* réduirait la migration des INs en empêchant l'activation de la voie de signalisation de Rac1 rendant les INs incapables d'amorcer la migration. Nous avons également comme hypothèse que la morphologie des INs en migration serait altérée étant donné que *Trio* semble se situer dans plusieurs voies de signalisation impliquées dans le guidage axonal, le réarrangement du cytosquelette et dans les processus régulant la motilité cellulaire (Vidaki et al., 2011; Briançon-Marjollet et al., 2008; Martini et al., 2009).

L'évaluation de la proportion d'INs migrant jusqu'au cortex par rapport à ceux restant dans le MGE après la répression de *Trio* a, dans un premier temps, confirmé cette hypothèse. Un moins grand nombre d'INs a atteint le cortex lorsque *Trio* était réprimé. Ce résultat peut s'expliquer de deux façons. Il se pourrait que les INs transfectés avec le shARN à E13.5 subissent une sous-activation de Rac1 et perdent la capacité de sortir du cycle cellulaire, similairement aux données de Vidaki et al. De cette façon, seulement les INs qui auraient déjà entamé la migration à E13.5 auraient la capacité de migrer vers le cortex. La deuxième explication serait que la répression de *Trio* dans les INs en cours de migration réduirait leur capacité d'atteindre le cortex entre E13.5 et E16.5. Nous n'avons aucune donnée pour confirmer la première hypothèse. Cependant, les reconstructions morphologiques tendent à soutenir la deuxième explication. En effet, nos résultats ont montré que la longueur totale des neurites rostraux était plus grande chez les INs exprimant le shARN anti-*Trio*, mais non significative par rapport à celle des cellules témoins.

D'un autre côté, nos résultats indiquent que les INs déficients pour *Trio* présentent une complexité accrue au niveau distal de leur neurite rostral alors qu'au niveau proximal celle-ci semble réduite par rapport aux INs témoins. Une sous activation de RhoA et de Rac1, par répression de *Trio*, pourrait résulter en des neurites rostraux plus longs puisque l'inhibition de RhoA est déjà connue pour stimuler la croissance des neurites rostraux, alors

que l'inhibition de Rac1 diminue leur croissance (Causeret et al., 2004). Quoique nous n'ayons pas recueilli de données concernant la direction des INs, une plus grande complexité distale des neurites pourrait indiquer des défauts dans la guidance axonale et dans la réponse aux signaux chémotactiques (Ward et al., 2005). Étant donné que les INs déficients pour *Trio* produisent, de façon absolue, autant de branches sur leur neurite rostral que les INs témoins, les processus de production de nouveaux neurites ne seraient pas en cause. Des études ont montré que, dans des embryons nuls pour *Trio*, la netrine-1 échouait à activer Rac1 à travers le récepteur DCC (Briançon-Marjollet et al., 2008). Une hypothèse pourrait être que la migration des INs, lorsque *Trio* est réprimé, pourrait s'effectuer indépendamment de l'orientation normalement induite par la nétrine-1 qui attire les cônes de croissance vers la zone marginale, produisant des INs avec de nombreuses branches distalement qui ignorent cette source de signaux chémoattracteurs (Stanco et al., 2009). Ainsi, il y aurait production de nombreuses branches au lieu d'une seule branche stabilisée.

La reconstruction des INs a par la suite montré que la surface couverte par les corps cellulaires des INs transfectés avec le shARN anti-*Trio* était plus grande que celle des cellules exprimant le shARN témoin. Parallèlement, les INs exprimant le shARN anti-*Trio* présentaient des neurites caudaux plus longs qui contenaient plus de branches que les cellules témoins. Il a été déjà décrit qu'une répression de *Trio* menait à une sous-activation de RhoA à cause d'une réduction de l'activité GEF (Medley et al., 2000). Prises ensemble, ces données suggèrent effectivement une telle réduction. En effet, RhoA semble essentielle à la fois à la rétraction des neurites caudaux, mais aussi à l'avancement du noyau. Selon la littérature, nous savons que la rétraction des neurites dépend de l'activité de la myosine II, qui elle-même dépend de sa phosphorylation par les protéines régulatrices: la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK) et RhoA-kinase (Evsyukova et al., 2013; Guo et Anton, 2014). L'inhibition de celles-ci a été décrite comme augmentant le nombre de neurites caudaux ainsi que leur longueur, ce qui explique une partie du phénotype observé (Kollins et al., 2009). Similairement, une étude a montré que RhoA et la protéine kinase associée à Rho (ROCK) étaient nécessaires à la protéine mDia pour le transport antérograde de la F-actine vers le MTOC servant à la translocation nucléaire (Shinohara et al., 2012). Une perte de mDia ou de ses protéines régulatrices menait à un moins grand avancement du MTOC dans le neurite rostral avant la nucléokinese (Shinohara et al., 2012). Une plus

petite séparation entre le MTOC et le noyau chez les INs transfectés avec le shARN anti-*Trio* aurait donc pu produire des corps cellulaires apparaissant plus étendus, étant donné qu'aucun marqueur pour le MTOC n'a été utilisé pendant les reconstructions neuronales (Martini et al., 2009; Causeret et al., 2004; Tsai et Gleeson, 2005; Klominek et al., 1991).

Bien qu'il ne s'agisse que d'hypothèses, nos résultats obtenus en faisant l'expérience sauvetage avec le shARN anti-*Trio* et la forme constitutivement active de RhoA renforcent ces explications. En effet, il semble que l'expression de RhoA Q63L permet de récupérer un phénotype équivalent à celui du groupe témoin lorsqu'il s'agit de l'aire couverte par le corps cellulaire, de la longueur et du nombre de branches du neurite caudal.

Les résultats de l'expérience de sauvetage avec l'ADNc de *Trio* indiquent que les effets observés avec notre shARN sont probablement spécifiques à la répression de *Trio* (et non à des effets non désirés sur d'autres cibles). Le sauvetage incomplet pour certains paramètres que nous avons évalué, comme la proportion d'INs migrant jusqu'au cortex et la longueur des neurites caudaux, pourrait s'expliquer par l'importance d'une régulation fine de *Trio* au niveau endogène. La transfection des neurones avec un plasmide exprimant l'ADNc sans contrôle sur son niveau d'expression mènerait vraisemblablement à un déséquilibre dans les processus de migration cellulaire expliquant une partie des phénotypes observés. Il est également possible que l'isoforme longue de *Trio*, utilisée ici pour effectuer l'expérience de sauvetage, ne reflète pas l'expression endogène et que d'autres isoformes soient exprimées plus fortement dans ces cellules à ce stade. Il faudrait donc vérifier cette possibilité en déterminant d'abord quelle isoforme est exprimée à ce stade (par rtPCR sur des cellules du MGE et possiblement sur des INs en migration extraits par FACS) puis tenter une expérience de sauvetage en utilisant l'isoforme la plus commune à ce stade plutôt que l'isoforme longue. Ceci est en cours grâce aux travaux d'autres membres du laboratoire Rossignol.

L'analyse des résultats nécessite aussi que nous considérions que l'ensemble des INs migrant vers le cortex à E15.5 n'exprime pas *Trio* (Figure 3). Ainsi l'extrapolation de nos résultats pour l'ensemble des INs GABAergiques corticaux ne peut être fait sans réserve. Cependant, la variabilité relativement faible dans nos résultats de reconstruction neuronale ainsi que le fait d'avoir électroporé les INs à un moment fixe de leur genèse

(e13.5) suggère que nous avons pu viser une population relativement homogène d'INs issus du MGE et que ceux-ci sont affectés de façon semblable par le shARN.

Notre découverte révélant la persistance d'expression de *Trio* dans les INs en période postnatale ouvre également un nouveau champ d'exploration. En effet, le rôle de *Trio* dans le développement des INs en période postnatale doit être exploré. Nous pourrions, à l'aide d'une approche biolistique et d'un shARN anti-*Trio* transfecté à P10, déterminer le rôle de la protéine dans le développement dendritique postnatal des INs GABAergiques corticaux en vue d'établir si la perte de fonction de *Trio* peut mener à une arborisation dendritique anormale des INs et perturber la connectivité corticale.

Enfin, l'identification de mutations hétérozygotes composées dans le gène *TRIO* chez un patient avec spasmes infantiles suggère que la perte de fonction du gène *TRIO* est une nouvelle cause d'épilepsie, possiblement par le biais d'une altération de la migration des INs causant un déséquilibre entre inhibition et excitation au niveau. Clarifier les mécanismes par lesquels des mutations de ce gène entraînent l'épilepsie permettra éventuellement de générer des traitements plus spécifiques et possiblement plus efficaces pour les patients porteurs de cette condition génétique. Pour ce faire, nous pourrions évaluer l'effet des mutations du gène *TRIO* du patient en électroporant à la fois un plasmide exprimant le shARN anti-*Trio* et un plasmide exprimant l'ARNm de *Trio* mutée. Ceci permettrait de voir si les mutations du patient causent effectivement une perte de fonction de la protéine et des troubles autant dans la morphologie que dans la migration des INs. De plus, une souris porteuse de délétion conditionnelle de *Trio* a été générée récemment et nous avons établi une collaboration avec les auteurs afin d'importer cette souris que nous croiserons avec la souris *Nkx2.1<sup>Cre</sup>* afin d'évaluer l'impact de la délétion de *Trio* dans les INs du MGE *in vivo*. Cette nouvelle souris nous permettra de valider nos trouvailles *in vitro* et d'étudier les conséquences cliniques d'une telle délétion, en particulier sur le développement comportemental et sur l'émergence de crises d'épilepsie.

La principale limite de l'étude est le fait que l'efficacité du shARN anti-*Trio* n'a pas été vérifiée. Pour ce faire, il aurait fallu utiliser un essai *in vitro* dans lequel les cellules auraient été transfectées avec deux plasmides: un contenant le shARN avec le gène rapporteur *tdTomato* et l'autre avec l'ADNc de *Trio* sensible au shARN et muni d'un marqueur comme la EGFP. La quantification de l'efficacité du shARN aurait alors pu se

faire par immunofluorescence et par Western-Blot. La présence d'un phénotype cellulaire clair en présence de notre shARN expérimental par rapport au shARN témoin suggère un effet relativement spécifique de notre shARN expérimental. De plus, cet ARN interférant avait été utilisé et démontré efficace précédemment (Charasse et al., 2007).

Nous n'avons pas fait d'expérience dans le but de vérifier la spécificité de l'anticorps anti-TRIO. Cependant, nos données sur l'expression de *Trio* sont tirées d'immunohistochimie faites avec un anticorps commercial. La spécificité de celui-ci devra être validé ultérieurement lorsque nous obtiendrons la souris *Trio*<sup>-/-</sup>, ce qui nous permettra alors de confirmer que le signal présent chez les souris sauvages disparaît dans la souris mutante. Une étude par hybridation *in situ* aurait également pu aider à confirmer le patron d'expression de *Trio*. Par ailleurs, nous avons maintenant des données préliminaires par RT-PCR sur des cellules extraites du MGE de souris *Dlx5/6-EGFP* qui confirme que certaines isoformes de *Trio* sont exprimées dans les INs GABAergiques corticaux au jour embryonnaire E15.5

Aucune tendance claire ne peut être formulée à partir des données de migration et de reconstruction des INs lors des expériences sauvetages avec l'ADNc de *Trio* et avec RhoA Q63L, car la quantification s'est effectuée seulement à partir de cellules provenant d'un seul cerveau. D'autres expériences avec ces plasmides seront donc répétées par d'autres membres du laboratoire Rossignol. Enfin, pour étudier nos hypothèses quant à la dynamique de la nucléokinèse et de croissance et rétraction des neurites des INs en migration, il faudra suivre la migration des INs par imagerie en direct plutôt que de les fixer après 72 h. Ceci est maintenant amorcé par une stagiaire post-doctorale.

## **Conclusion**

Finalement, en accord avec nos hypothèses, nos données suggèrent que *Trio* joue un rôle primordial dans la régulation de la morphologie des INs GABAergiques corticaux en promulguant leur migration tangentielle du MGE vers le cortex. *Trio* serait alors un régulateur au niveau temporel des mécanismes qui soutiennent la migration cellulaire des INs comme la nucléokinèse, le remodelage du cytosquelette, l'élongation de neurites rostraux, leur guidance et la rétraction des neurites caudaux. Une surexpression de celui-ci mènerait possiblement à une migration accrue. Il agirait donc en amont de plusieurs voies de signalisation de concert avec d'autres protéines permettant l'alternance entre l'état actif et inactif de protéines de signalisation telles que RhoA/ROCK et Rac1. Les mécanismes par lesquels *Trio* régule ces processus devront être explorés ultérieurement. Néanmoins, nos données actuelles permettent d'approfondir notre compréhension des rôles de *Trio* dans le développement des circuits neuronaux et pourront, ultimement, aider à mieux comprendre la pathogenèse des troubles neurodéveloppementaux (autisme, déficience intellectuelle, épilepsie) associés aux mutations de ce gène.

## **Bibliographie**

Al-Jaberi N, Lindsay S, Sarma S, Bayatti N, Clowry GJ (2015) The Early Fetal Development of Human Neocortical GABAergic Interneurons. *Cereb Cortex*. 25(3):631-645.

Anderson SA, Marin O, Horn C, Jennings K, Rubenstein JLR (2001) Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128:353-363.

Ang Jr ES, Haydar TF, Gluncic V, Rakic P (2003) Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. *J Neurosci* 23:5305-5815.

Ba W, Yan Y, Reijnders MR, Schuurs-Hoeijmakers JH, Feenstra I, Bongers EM, Bosch DG, De Leeuw N, Pfundt R, Gilissen C, De Vries PF, Veltman JA, Hoischen A, Mefford HC, Eichler EE, Vissers LE, Nadif Kasri N, De Vries BB (2016) TRIO loss of function is associated with mild intellectual disability and affects dendritic branching and synapse function. *Hum Mol Genet* 25(5):892-902.

Backer S, Hidalgo-Sanchez M, Offner N, Portales-Casamar E, Debant A, Fort P, Gauthier-Rouvière C, Bloch-Gallego E (2007) Trio Controls the Mature Organization of Neuronal Clusters in the Hindbrain. *J Neurosci* 27:10323-10332.

Batista-Brito R, Rossignol E, Hjerling-Leffler J, Denaxa M, Wegner M, Lefebvre V, Pachnis V, Fishell G. (2009) The cell-intrinsic requirement of Sox6 for cortical interneuron development. *Neuron*. 63(4): 466-81.

Bellanger JM, Estrach S, Schmidt S, Briançon-Marjollet A, Zugasti O, Fromont S, Debant A (2003) Different regulation of the Trio Dbl-Homology domains by their associated PH domains. *Biol Cell*. 95(9):625-34.

Bellanger J-M, Lazaro J-B, Diriong S, Fernandez A, Lamb B, Debant A (1998) The two guanine nucleotide exchange factor domains of Trio link Rac1 and the RhoA pathways *in vivo*. *Oncogene* 16:147-152.

Bellion A, Baudoin JP, Alvarez C, Bornens M, Métin C (2005) Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the

Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J Neurosci* 25(24):5691-9.

Blangy A, Vignal E, Schmidt S, Debant A, Gauthier-Rouvière C, Fort P (2000) TrioGEF1 controls Rac- and Cdc42-dependent cell structures through the direct activation of rhoG. *J Cell Sci* 113:729-39.

Briançon-Marjollet A, Ghogha A, Nawabi H, Triki I, Auziol C, Fromont S, Piché C, Enslin H, Chebli K, Cloutier J-F, Castellani V, Debant A, Lamarche-Vane N (2008) Trio Mediates Netrin-1-Induced Rac1 Activation in Axon Outgrowth and Guidance. *Mol Cell Biol* 28:2314-2323.

Cannet A, Schmidt S, Delaval B, Debant A (2014) Identification of a mitotic Rac-GEF, Trio, that counteracts MgcRacGAP function during cytokinesis. *Mol Biol Cell* 25:4063-4071.

Causeret F, Hidalgo-Sanchez M, Fort P, Backer S, Popoff M-R, Gauthier-Rouvière C, Bloch-Gallego E (2004) Distinct roles of Rac1/Cdc42 and Rho/Rock for axon outgrowth and nucleokinesis of precerebellar neurons toward netrin 1. *Development* 131:2841-2852.

Carrascosa-Romero MC et De La Vega CDC (2016) GABAergic Interneurons in Severe Early Epileptic Encephalopathy with a Suppression-Burst Pattern: A Continuum of Pathology. *Intech*. DOI: 10.5772/64458

Charrasse S, Comunale F, Fortier M, Portales-Casamar E, Debant A, Gauthier-Rouvière C (2007) M-Cadherin Activates Rac1 GTPase through the Rho-GEF Trio during Myoblast Fusion. *MBC* 18:1734-1743.

Chattopadhyay I, Singh A, Phukan R, Purkayastha J, Katakai A, Mahanta J, Saxena S, Kapur S (2010) Genome-wide analysis of chromosomal alterations in patients with esophageal squamous cell carcinoma exposed to tobacco and betel quid from high-risk area in India. *Mutat Res* 696:130-138.

Chen S-Y, Huang P-H, Cheng H-J (2010) Disrupted-in-Schizophrenia 1-mediated axon guidance involves TRIO-RAC-PAK small GTPase pathway signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5861-5866.

Colasante G, Sessa A (2010) Last But Not Least: Cortical Interneurons from Caudal Ganglionic Eminence. *J Neurosci* 30:7449-7450.

Debant A, Serra-Pagès C, Seipel K, O'Brien S, Tang M, Park SH, Streuli M (1996) The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(11):5466-71.

DeGeer J, Kaplan A, Mattar P, Morabito M, Stochaj U, Kennedy TE, Debant A, Cayouette M, Fournier AE, Lamarche-Vane N (2015) Hsc70 chaperone activity underlies Trio GEF function in axon growth and guidance induced by netrin-1. *J Cell Biol* 210(5): 817-832.

Denaxa M, Chan C-H, Schachner M, Parnavelas JG, Karagogeos D (2001) The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development* 128:4635-4644.

Depienne C, Gourfinkel-An I, Baulac S, LeGuern E (2012) Genes in infantile epileptic encephalopathies. Dans: *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* (Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, et al., éditeurs), Bethesda: National Center for Biotechnology Information.

Elias LA, Turmaine M, Parnavelas JG, Kriegstein AR (2010) Connexin 43 mediates the tangential to radial migratory switch in ventrally derived cortical interneurons. *J Neurosci* 30:7072-7077.

Estrach S, Schmidt S, Diriong S, Penna A, Blangy A, Fort P, Debant A (2002) The human Rho-GEF Trio and its target GTPase RhoG are involved in the NGF pathway, leading to neurite outgrowth. *Curr Biol* 12:306-312.

Evsyukova I, Plestant C, Anton ES (2013) Integrative Mechanisms of Oriented Neuronal Migration in the Developing Brain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:299-353.

Flames N, Long JE, Garratt AN, Fischer TM, Gassmann M, Birchmeier C, Lai C, Rubenstein JLR, Marin O (2004) Short- and Long-Range Attraction of Cortical GABAergic Interneurons by Neuregulin-1. *Neuron* 44:251-261.

Flames N, Pla R, Gelman DM, Rubenstein JL, Puelles L, Marin O (2007) Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes. *J Neurosci* 27:9682-9695.

Gelman DM, Marin O, Rubenstein JLR (2012) The Generation of Cortical Interneurons. In: *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* (Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, ed), pp1-13. Bethesda: National Center for Biotechnology Information.

Godin JD, Thomas N, Laguesse S, Malinouskaya L, Close P, Malaise O, Purnelle A, Raineteau O, Campbell K, Fero M, Moonen G, Malgrange B, Chariot A, Metin C, Besson A, Nguyen L (2012) p27<sup>kip</sup> Is a Microtubule-Associated Protein that Promotes Microtubule Polymerization during Neuron Migration. *Dev Cell* 23:729-744.

Govek EE, Newey SE, Van Aelst L (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* 19(1):1-49.

Guo J, Anton ES (2014) Decision Making during Interneuron Migration in the Developing Cerebral Cortex. *Trends Cell Biol* 24:342-351.

Katayama K, Imai F, Campbell K, Lang RA, Zheng Y, Yoshida Y (2013) RhoA and Cdc42 are required in pre-migratory progenitors of the medial ganglionic eminence ventricular zone for proper cortical interneuron migration. *Development* 140(15):3139-45.

Katamaya K, Melendez J, Baumann JM, Leslie JR, Chauhan BK, Nemkul N, Lang RA, Kuan CY, Zheng Y, Yoshida Y (2011) Loss of RhoA in neural progenitor cells causes the disruption of adherens junctions and hyperproliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(18):7607-12.

Kawabata I, Kashiwagi Y, Obashi K, Ohkura M, Nakai J, Wynshaw-Boris A, Yanagawa Y, Okabe S. (2012) LIS1-dependant retrograde translocation of excitatory synapses in developing interneuron dendrites. *Nat Commun.* 6(3): 722.

Klominek J, Sundqvist K-G, Robért K-H (1991) Nucleokinesis: Distinct pattern of cell translocation in response to an autocrine motility factor-like substance of fibronectin. *Proc Natl Acad Sci* 88:3902-3906.

Kollins KM, Hu J, Bridgman PC, Huang Y-Q, Gallo G (2009) Myosin-II Negatively Regulates Minor Process Extension and the Temporal Development of Neuronal Polarity. *Dev Neurobiol* 69:279-298.

Leventer RJ, Guerrini R, Dobyns WB. (2008) Malformations of cortical development and epilepsy. *Dialogues Clin Neurosci.* 10(1): 47-62.

Long H, Yoshikawa S, Thomas JB (2016) Equivalent Activities of Repulsive Axon Guidance Receptors. *J Neurosci* 36(4):1140-50.

Lopez-Bendito G, Sanchez-Alcaniz JA, Pia R, Borrell V, Pico E, Valdeolmillos M, Marin O (2008) Chemokine signaling controls intracortical migration and final distribution of GABAergic interneurons. *J Neurosci* 28(7):1613-24.

Lysko DE, Putt M, Golden JA. (2014) SDF1 Reduces Interneuron Leading Process Branching through Dual Regulation of Actin and Microtubules. *J Neurosci.* 34(14): 4941-4962.

Ma HT, On KF, Tsang YH, Poon RYC (2007) An inducible system for expression and validation of the specificity of short hairpin RNA in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 35:1-7.

Ma X-M, Huang J-P, Eipper B. A, Mains RE (2005) Expression of Trio, a Member of the Dbl Family of Rho GEFs in the Developing Rat Brain. *J Comp Neurol* 482:333-348.

MacDonald RB, Pollack JN, Debais-Thibaud M, Heude E, Talbot JC, Ekker M (2013) The *ascl1a* and *dlx* genes have a regulatory role in the development of GABAergic interneurons in the zebrafish diencephalon. *Dev Biol* 381:276-285.

Marin O, Rubenstein JLR (2001) A LONG, REMARKABLE JOURNEY: TANGENTIAL MIGRATION IN THE TELEENCEPHALON. *Nature* 2:780-790.

Marin O, Yaron A, Bagri A, Tessier-Lavigne M, Rubenstein JL (2001) Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 293:872-877.

Marin O, Valiente M, Ge X, Tsai L-H (2010) Guiding Neuronal Cell Migrations. *Perspect Biol* 2:1-20.

Martini FJ, Valdeolmillos M. (2010) Actomyosin contraction at the cell rear drives nuclear translocation in migrating cortical interneurons. *J Neurosci.* 30(25): 8660-70.

Martini FJ, Valiente M, Lòpez Bendito G, Szabò G, Moya F, Valdeolmillos M, Marin O (2009) Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. *Development* 136:41-50.

Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) INTERNEURONS OF THE NEOCORTICAL INHIBITORY SYSTEM. *Nature* 5:793-807.

McConnell SK, Kaznowski CE (1991) Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. *Science* 254:282-285.

Medley QG, Serra-Pagès C, Iannotti E, Seipel K, Tang M, O'Brien SP, Streuli M (2000) The Trio Guanine Nucleotide Exchange Factor Is a RhoA Target. *The Journal of Biological Chemistry* 275:36116-36123.

Merlo GR, Zerega B, Paleari L, Trombino S, Mantero S, Levi G (2000) Multiple functions of Dlx genes. *Int J Dev Biol* 44:619-626.

Métin C, Godement P. The ganglionic eminence may be an intermediate target for corticofugal and thalamocortical axons. *J. Neurosci.* 1996;16:3219–3235.

Michaud JL, Lachance M, Hamdan FF, Carmant L, Lortie A, Diadori P, Major P, Meijer IA, Lemyre E, Cossette P, Mefford HC, Rouleau GA, Rossignol E (2014) The genetic landscape of infantile spasms. *Hum Mol Genet* 23:4846-4858.

Nadarajah B, Alifragis P, Wing RO, Parnavelas JG (2002) Ventricule-directed migration in the developing cerebral cortex. *Nat Neurosci* 5:218-224.

Neske GT, Connors BW (2016) Distinct Roles of SOM and VIP Interneurons during Cortical Up States. *Front Neural Circuits* 10:52.

Noh GJ, Jane Tavyev Asher Y, Graham JM Jr. (2012) Clinical review of genetic epileptic encephalopathies. *Eur J Med Genet.* 55(5): 281-98.

O'Brien SP, Seipel K, Medley QG, Bronson R, Segal R, Streuli M (2000) Skeletal muscle deformity and neuronal disorder in Trio exchange factor-deficient mouse embryos. *PNAS* 97:12074-12078.

Ota H, Hikita T, Sawada M, Nishioka T, Matsumoto M, Komura M, Ohno A, Kamiya Y, Miyamoto T, Asai N, Enomoto A, Takahashi M, Kaibuchi K, Sobue K, Sawamoto K (2014) Speed control for neuronal migration in the postnatal brain by Gmip-mediated local inactivation of RhoA. *Nat Commun.* 30(5):4532.

Panayiotopoulos CP (2005) Epileptic Encephalopathies in Infancy and Early Childhood in Which the Epileptiform Abnormalities May Contribute to Progressive Dysfunction. In: *The Epilepsies: Seizures, Syndromes and Management.* pp161-243 Oxfordshire: Bladon Medical Publishing.

Peyre E, Silva CG, Nguyen L (2015) Crosstalk between intracellular and extracellular signals regulating interneuron production, migration and integration into the cortex. *Front Cell Neurosci* 9:129.

Pla R, Borrell V, Flames N, Marin O (2006) Layer Acquisition by cortical GABAergic Interneurons Is Independent of Reelin Signaling. *J Neurosci* 26:6924-6934.

Reiner O. (2013) LIS1 and DCX: Implications for Brain Development and Human Disease in Relation to Microtubules. *Scientifica.* 2013:1-17.

Rossignol E (2011) Genetics and Function of Neocortical GABAergic Interneurons in Neurodevelopmental Disorders. *Neural Plast* 2011:1-25.

Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J. (2011) Three Groups of Interneurons Account for Nearly 100% of Neocortical GABAergic Neurons. *Dev Neurobiol.* 71(1): 45-61.

Sanchez-Freire V, Ebert AD, Kalisky T, Quake SR, Wu JC (2012) Microfluidic single-cell real-time PCR for comparative analysis of gene expression patterns. *Nat Protoc* 7:829-838.

Scheyltjens I, Arckens L (2016) The Current Statut of Somatostatin-Interneurons in Inhibitory Control of Brain Function and Plasticity. *Neural Plast* 1-20.

Schiller MR, Chakrabarti K, King GF, Schiller NI, Eipper BA, Maciejewski MW (2006) Regulation of RhoGEF Activity by Intramolecular and Intermolecular SH3 Domain Interactions. *J Biol Chem* 281:18874-86.

Schmidt S, Debant A (2014) Function and regulation of the Rho guanine nucleotide exchange factor Trio. *Small GTPases* 5:1-10.

Shinohara R, Thumkeo D, Kamijo H, Kaneko N, Sawamoto K, Watanabe K, Takebayashi H, Kiyonari H, Ishizaki T, Furuyashiki T, Narumiya S (2012) A Role for mDia, a rho regulated actin nucleator, in tangential migration of interneuron precursors. *Nat Neurosci* 15(3):373-80.

Shivalkar M et Giniger E (2012) Control of Dendritic Morphogenesis by Trio in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 7(3):1-10.

Son K, Smith TC, Luna EJ (2015) Supervillin binds the Rac/Rho-GEF Trio and increases Trio-mediated Rac1 activation. *Cytoskeleton* 72(1):47-64.

Spruston N (2008) Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature* 9:206-221.

Stanco A, Szekeres C, Patel N, Rao S, Campbell K, Kreidberg JA, Polleux F, Anton ES (2009) Netrin-1- $\alpha 3\beta 1$  integrin interactions regulate the migration of interneurons through the cortical marginal zone. *PNAS* 106:7595-7600.

Steven R, Zhang L, Culotti J, Pawson T (2005) The UNC-73/Trio RhoGEF-2 domain is required in separate isoforms for the regulation of pharynx pumping and normal neurotransmission in *C. elegans*. *Genes Dev* 19(17):2016-2029.

Sultan KT, Brown KN, Shi SH (2013) Production and organization of neocortical interneurons. *Front Cell Neurosci* 7:221.

Thompson AM, Bannister AP (2003) Interlaminar Connections in the Neocortex. *Cereb Cortex* 13:5-14.

Tivodar S, Kalemaki K, Kounoupa Z, Vidaki M, Theodorakis K, Denaxa M, Kessarar N, De Curtis I, Pachnis V, Karagogeos D (2014) Rac-GTPases Regulate Microtubule Stability and Axon Growth of Cortical GABAergic Interneurons. *Cereb Cortex* 1-13.

Trivedi N, Ramahi JS, Karakaya M, Howell D, Kerekes RA, Solecki D (2014) Leading-process actomyosin coordinates organelle positioning and adhesion receptor dynamics in radially migrating cerebellar granule neurons. *Neural Dev* 9:1-19.

Trivedi N, Solecki DJ. (2011) Neuronal migration illuminated: A look under the hood of the living neuron. *Cell Adh Migr.* 5(1): 42-47.

Tsai L-H, Gleeson JG (2005) Nucleokinesis in Neuronal Migration. *Neuron* 46:383-388.

Valdeolmillos M, Moya F (2013) Leading Process Dynamics During Neuronal Migration. Dans: *Cellular Migration and Formation of Neuronal Connections* (Rubenstein J, Rakic P, éditeurs), pp245-281. Oxford: Elsevier.

Vallee RB, Seale GE, Tsai JW (2009) Emerging roles for myosin II and cytoplasmic dynein in migrating neurons and growth cones. *Trends Cell Biol* 19(7):347-355.

Van den Berghe V, Stappers E, Vandesande B, Dimidschstein J, Kroes R, Francis A, Conidi A, Lesage F, Dries R, Cazzola S, Berx G, Kessarar N, Vanderhaeghen P, van Ijcken W, Grosveld FG, Goossens S, Haigh JJ, Fishell G, Goffinet A, Aerts S, Huylebroeck D, Seuntjens E. (2013) Directed migration of cortical interneurons depends on the cell-autonomous action of Sip1. *Neuron*. 77(1): 70-82.

Vidaki M, Tivodar S, Doulgeraki K, Tybulewicz V, Kessaris N, Pachnis V, Karagogeos D (2011) Rac1-Dependent Cell Cycle Exit of MGE Precursors and GABAergic Interneuron Migration to the Cortex. *Cereb Cortex* 22:680-692.

Vincente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR (2009) Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(11):778-90.

Wang Y, Dye CA, Sohal V, Long JE, Estrada RC, Roztocil T, Lufkin T, Deisseroth K, Baraban SC, Rubenstein JLR (2010) Dlx5 and Dlx6 Regulate the Development of Parvalbumin-Expressing Cortical Interneurons. *J Neurosci* 30:5334-5345.

Ward ME, Jiang H, Rao Y (2005) Regulated formation and selection of neuronal processes underlie directional guidance of neuronal migration. *Mol Cell Neurosci* 30:378-387.

Xu Q, Cruz E, Anderson SA (2003) Cortical Interneuron Fate Determination: Diverse Sources for Distinct Subtypes? *Cereb Cortex* 13:670-676.

Zerucha T, Stuhmer T, Hatch G, Park BK, Long Q, Yu G, Gambarotta A, Schultz JR, Rubenstein JL, Ekker M (2000) A highly conserved enhancer in the Dlx5/Dlx6 intergenic region is the site of cross-regulatory interactions between Dlx genes in the embryonic forebrain. *J Neurosci* 20:709-721.

Zong W, Liu S, Wang X, Zhang J, Zhang T, Liu Z, Wang D, Zhang A, Zhu M, Gao J (2015) Trio gene is required for mouse learning ability. *Brain Res* 1608:82-90.