

Université de Montréal

Investigation du rôle de *Myo9b* dans la migration des interneurons GABAergiques corticaux

par Lydia Marcoux

Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise en
Biochimie, option génétique moléculaire

Janvier 2016

©, Lydia Marcoux, 2016

Résumé

Les encéphalopathies épileptogènes sont des maladies graves de l'enfance associant une épilepsie, souvent réfractaire, et un retard de développement. Les mécanismes sous-tendant ces maladies sont peu connus. Cependant, nous postulons que ces épilepsies puissent être causées par une dysfonction du réseau inhibiteur. En effet, des défauts de migration ou de maturation des interneurons GABAergiques (INs) corticaux induisent l'épilepsie, tant chez l'humain que chez la souris. Dans le but d'étudier les causes génétiques des encéphalopathies épileptogènes sporadiques inexplicées, le laboratoire de la Dre Rossignol a procédé au séquençage d'exome entier d'une cohorte d'enfants atteints. Cela a permis d'identifier, chez un patient, une nouvelle mutation *de novo*, possiblement pathogène, dans le gène *MYO9b*. *MYO9b* est impliqué dans la migration de cellules immunitaires et cancéreuses et est exprimée durant le développement cérébral. Nous émettons l'hypothèse voulant que *MYO9b* puisse être importante pour la migration des INs corticaux. Les résultats présentés dans ce mémoire démontrent que *Myo9b* est exprimé dès le stade embryonnaire par les progéniteurs des INs corticaux et que son expression se restreint aux INs dans le cortex mature. De plus, nous démontrons que la répression *ex vivo* de *Myo9b* sélectivement dans les INs au sein de tranches corticales organotypiques embryonnaires mène à des défauts morphologiques majeurs de ces cellules en migration. En effet, ces cellules présentent une morphologie multipolaire et des neurites rostraux plus longs et plus complexes. Ces changements morphologiques pourraient avoir un impact majeur sur la migration des INs et ainsi perturber le développement des réseaux inhibiteurs.

Mots clés : Myo9b, Myosine IXb, migration tangentielle, interneurons GABAergiques, épilepsie, encéphalopathie épileptogène, cytosquelette, actine, tubuline.

Abstract

Epileptic encephalopathies are early-onset diseases characterized by refractory epilepsy with developmental delay. To identify the underlying genetic cause of these disorders, Dr Rossignol's laboratory has performed whole-exome sequencing in children with sporadic epileptic encephalopathies. They have identified a novel de novo mutation in the *MYO9B* gene in one patient. *Myo9b* is known to regulate cell migration in the immune system and in cancer cells. It is expressed in the developing rodent brain, but its roles during brain development are largely unknown. Recent evidence suggests that epilepsy can be caused by an imbalance between inhibition and excitation in cortical circuits. Indeed, defects in the development or the functions of cortical GABAergic interneurons (INs) have been associated with epilepsy in human and in mouse models. Therefore, we postulated that *Myo9b* might play a role in the development of INs. In this thesis, I show that *Myo9b* is expressed in INs from early embryonic ages to post-natal ages. Furthermore, I demonstrate that the ex vivo downregulation of *Myo9b* in INs in cortical embryonic organotypic cultures causes morphological defects in migrating INs, including aberrant polarization of these cells. These morphological changes might result in aberrant IN migration, which would be expected to perturb the cortical inhibitory-excitatory ratio.

Keywords: Myo9b, Myosine IXb, tangential migration, GABAergic interneurons, epileptic encephalopathy, epilepsy, cytoskeleton, actin, tubulin.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract	iii
Table des matières	iv
Liste des figures	v
Liste des abréviations	vi
Remerciements	viii
Introduction.....	1
1- Survol du développement du système nerveux central.....	3
2- Origines et diversité des interneurons GABAergiques corticaux	6
a. MGE :	9
b. CGE :	11
c. POa :	11
3- Migration des INs corticaux.....	12
a. Activation de la migration.	12
b. Migration vers la plaque corticale.....	15
c. Voies de migration tangentielle	15
d. Transition vers la migration radiale.....	16
e. Allocation laminaire	17
f. Arrêt de la migration	17
4- Dynamique du cytosquelette	18
5- Altération du développement des INs dans l'épilepsie.....	22
6- <i>Myo9b</i>	24
Question de recherche	29
Hypothèse et objectifs	30
Méthodologie	31
Résultats	45
Discussion.....	58
Conclusion	67
Références.....	68

Liste des figures

Figure 1 : Schématisation de la neurulation.....	4
Figure 2 : Diversité des interneurons GABAergiques corticaux.	8
Figure 3. Schématisation de la migration des interneurons corticaux.....	14
Figure 4 : Dynamique du cytosquelette d'un interneurone en migration	19
Figure 5 : Schématisation de la structure et de la fonction de MYO9b	26
Figure 6 : Plasmides <i>Dlx5/6-shARN6-IRES2-tdTOMATO</i> et <i>Dlx5/6-shMyo9b-IRES2-tdTOMATO</i>	38
Figure 7 : Schématisation de l'électroporation <i>ex vivo</i>	42
Figure 8 : Localisation embryonnaire de MYO9b	46
Figure 9 : Localisation de MYO9b dans le cerveau adulte.....	48
Figure 10 : La répression de <i>Myo9b</i> altère la morphologie des INs en migration.	53

Liste des abréviations

- BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor* (facteur neurotrophique dérivé du cerveau)
- CGE : Éminence ganglionnaire caudale
- CR : Calrétinine
- CREB: *cAMP response element-binding protein* (protéine liant l'élément de réponse à l'AMP cyclique)
- Efr : Éphrine
- Eph : Récepteur des éphrines
- F-actine : Actine filamenteuse
- FGF : *Fibroblast growth factor* (facteur de croissance des fibroblastes)
- GABA : Acide γ -aminobutyrique
- GAP : Protéine activatrice de GTPase
- GDNF : *Glial cell line-derived neurotrophic factor* (facteur de croissance dérivé d'une lignée de cellules gliales)
- GFP : protéine fluorescente verte
- HGF/SF : *Hepatocyte growth factor/scatter factor* (facteur de croissance des hépatocytes/facteur de dispersion)
- INs : Interneurones GABAergiques
- IZ : Zone intermédiaire
- LGE : Éminence ganglionnaire latérale
- MGE: Éminence ganglionnaire médiale
- MLC : Chaîne légère de la myosine
- MLCK : Kinase de la chaîne légère de la myosine
- MLCP : Phosphatase de la chaîne légère de la myosine
- MTs : Microtubules
- MZ : Zone marginale

- Ngf : Névrogliiforme
- NPY : Neuropeptide Y
- Nrg1 : Neureguline-1
- NRP: Récepteur neuropiline
- PC : Plaque corticale
- PCP: Polarité cellulaire planaire
- PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
- PLXR: Récepteur plexine
- POa : Aire préoptique
- PV : Parvalbumine
- RMP : Révolution par minute
- Shh : Sonic Hedgehog
- SNC : Système nerveux central
- SP : Sous-plaque
- SST : Somatostatine
- SVZ : Zone sous-ventriculaire
- TE : Tampon Tris-EDTA
- VIP : Peptide vasoactif intestinal
- VSCC: Canaux calciques voltage-sensibles
- VZ : Zone ventriculaire

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Dre Elsa Rossignol pour m'avoir donné ma chance dans son laboratoire. Merci de m'avoir encadrée et de m'avoir soutenue tout au long de ma maîtrise, malgré les étapes difficiles que j'ai dû traverser durant ces années. Merci pour toute ton expérience qui m'a permis d'en apprendre beaucoup plus que j'imaginai et pour tes conseils et tes encouragements qui m'ont permis de réussir à obtenir de beaux résultats. Finalement, merci pour ta confiance.

Un immense merci à Mathieu Lachance, notre formidable assistant de recherche. Merci pour tes longues heures de travail et pour ta patience. Si j'ai réussi à finir ce mémoire, c'est beaucoup grâce à ton soutien et à ton aide. Merci d'être toujours là quand on a besoin de parler, que ce soit de sciences ou de n'importe quoi. Merci d'être aussi passionné et imaginatif. Grâce à ces qualités, tu arrives toujours à trouver des solutions aux différents problèmes. Merci pour tes conseils avisés et pour ton sens de l'humour qui m'ont permis de me sentir à l'aise rapidement dans le laboratoire.

Je voulais remercier tous les membres du laboratoire. Merci à James pour son aide pour mon anglais, pour ces heures de génotypage et pour sa gentillesse. Merci à Jade pour son soutien et pour son aide. C'est toujours apprécié d'avoir quelqu'un sur qui on peut compter. Merci à Alexis pour son humour et son aide en statistiques. Merci à Francine, pour m'avoir aidée et conseillée durant ma première année de maîtrise avec sa grande expérience. Je voulais aussi remercier le groupe de recherche en neurosciences de Ste-Justine. Ce groupe permet aux étudiants de côtoyer plusieurs gens d'horizons différents ayant une passion commune pour les neurosciences. Merci pour les rencontres scientifiques du lundi matin qui m'ont bien formée à présenter des résultats ou des articles scientifiques en plus d'augmenter mes connaissances dans plusieurs domaines des neurosciences. Merci aux membres du groupe avec lesquels j'ai pu avoir des conversations passionnantes qui m'ont beaucoup appris. Merci pour vos conseils et pour votre amitié.

Finalement, je voulais remercier ma famille et mes amis qui m'ont soutenue tout au long de ma maîtrise, aussi bien dans les périodes de bons résultats, que dans les périodes de grands stress où rien de fonctionnait. Merci d'être aussi compréhensifs et de faire semblant de comprendre. Un merci tout particulier à ma mère Mireille, à mes colocataires Sarah-Maude et Catherine et à Manoha pour leurs constants encouragements.

Introduction

Les encéphalopathies épileptogènes sont des maladies graves de l'enfance caractérisées par une épilepsie précoce accompagnée d'une déficience intellectuelle et/ou d'un retard du développement (1). Dans la plupart des cas, ces épilepsies sont réfractaires, c'est-à-dire qu'elles répondent peu ou pas du tout aux composés pharmacologiques. Les crises incontrôlées entraînent parfois une détérioration cognitive supplémentaire.

Les encéphalopathies épileptogènes regroupent plusieurs syndromes épileptiques qui se différencient par la combinaison spécifique de types de crises d'épilepsie (c.-à-d. absences, myoclonies, crises généralisées tonico-cloniques, spasmes axiaux, crises toniques, crises focales, etc.), la signature électroencéphalographique, l'âge d'apparition et les comorbidités (exemple : ataxie). Ces syndromes incluent, entre autres, le syndrome de West, aussi appelé spasmes infantiles, le syndrome d'Ohtahara, l'épilepsie focale migratoire du nourrisson, le syndrome de Dravet, le syndrome de Lennox-Gastaut, le syndrome de Landau-Kleffner, l'encéphalopathie épileptique avec pointes-ondes continues du sommeil et l'épilepsie à crises myoclonono-atoniques (2). Ces encéphalopathies peuvent être le résultat d'une lésion, par exemple d'une malformation corticale, ou des séquelles d'une infection prénatale, d'une hypoxie-ischémie néonatale ou d'une maladie métabolique. Cependant, dans environ 40% des cas, l'étiologie est inconnue; l'imagerie par résonance magnétique est normale, de même que les bilans infectieux et métaboliques. Ces cas inexplicés sont souvent dus à une cause génétique. Ainsi, près de 15% des patients avec encéphalopathies épileptogènes inexplicés sont porteurs de remaniements chromosomiques (3-5). De plus, une proportion significative de patients avec encéphalopathie épileptogène inexplicée est porteuse de mutations *de novo* dans des gènes importants pour le développement ou la fonction du cerveau (3, 6).

L'investigation génétique de patient avec encéphalopathie épileptogène nous permet d'élargir nos connaissances sur les causes de ces maladies, de raffiner le diagnostic et d'optimiser les traitements offerts. En effet, l'arrivée du séquençage à haut débit permet maintenant de recenser de plus en plus de mutation *de novo* dans de nouveaux gènes candidats, nous informant parfois sur les mécanismes impliqués dans l'épilepsie. De plus, l'identification de mutations dans des

gènes associés de façon récurrente aux encéphalopathies épileptogènes permet une meilleure classification des syndromes épileptiques et révèle parfois de nouveaux syndromes épileptiques associés à un nouveau gène (ex : épilepsie migratoire du nourrisson et mutations *de novo* du gène *KNCT1* (7)). Enfin, l'investigation génétique de patients avec encéphalopathie épileptogène permet un meilleur suivi des patients porteurs de mutations dans des gènes connus d'épilepsie. En effet, ceci facilite la prédiction du pronostic, permet un conseil génétique familial quant au risque de récurrence et oriente parfois les traitements. Cependant, chez plusieurs patients, les mécanismes par lesquels des mutations de gènes candidats causent l'épilepsie demeurent incertains. Une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à ces encéphalopathies épileptogènes par le biais d'études de validation fonctionnelle ou de modélisation animale pourra nous amener à développer des thérapies mieux adaptées pour ces patients (2).

Afin d'étudier les causes génétiques des encéphalopathies épileptogènes sporadiques inexplicables, le laboratoire de la Dre Rossignol a récemment procédé au séquençage d'exome de 18 trios familiaux (1 probant, 2 parents) d'enfants présentant un syndrome de West (spasmes infantiles), sans malformation cérébrale ni maladie métabolique (3). Par cette approche, plusieurs mutations *de novo* dans de nouveaux gènes candidats (non associés précédemment à l'épilepsie) ont pu être identifiées. De façon intéressante, en regroupant ces gènes selon leurs fonctions répertoriées par UNIPROT (www.uniprot.org), il a été possible de voir un enrichissement de gènes exprimés durant le développement du système nerveux central (SNC). De plus, 45% des gènes identifiés ont des fonctions prédites au niveau de la migration cellulaire et pourraient être impliqués dans la migration neuronale (3). Puisque les patients de cette cohorte ne présentent aucune malformation corticale, suggérant une migration intacte des cellules pyramidales (neurones excitateurs), nous avons émis l'hypothèse que ces mutations puissent affecter de façon préférentielle la migration d'une population neuronale minoritaire, tels les interneurons GABAergiques (INs). En effet, des défauts de migration des INs corticaux passent inaperçus lors des imageries de type IRM n'ayant pas de résolution cellulaire. De plus, des défauts dans la migration, la maturation ou la fonction des INs ont été impliqués dans différents troubles neuro-développementaux comme l'épilepsie et la schizophrénie, tant chez la souris que chez l'humain (voir revue (8, 9)). Pour toutes ces raisons, nous postulons que

certaines des mutations *de novo* identifiées altèrent le développement des INs. Parmi les gènes candidats identifiés dans cette cohorte, j'ai sélectionné le gène *MYO9b*, codant pour une myosine non-musculaire interagissant avec le cytosquelette d'actine, afin d'étudier son rôle dans le développement des INs. Je démontre qu'une perte de fonction de ce gène altère de façon significative la morphologie des INs en développement, et pourrait avoir un impact significatif sur la dynamique de la migration tangentielle des INs, tel que détaillé dans ce mémoire.

1- Survol du développement du système nerveux central

Le développement du SNC peut être divisé en 5 étapes, soit la neurulation, la prolifération, la migration, la différenciation cellulaire et la synaptogenèse (10). Juste avant la neurulation, l'embryon est formé de trois couches de tissu superposées en forme de disque. On retrouve sur la face interne de l'embryon, l'endoderme qui formera les poumons, le foie et les viscères. On retrouve sur la face externe de l'embryon, l'ectoderme, qui formera le système nerveux ainsi que l'épiderme. Enfin, entre ces deux tissus, on retrouve le mésoderme qui formera les os ainsi que les muscles (11).

La neurulation commence par un changement de certaines cellules de l'ectoderme pour former un nouveau tissu, le neurectoderme. Le changement de forme de ces cellules est le résultat de la différenciation des cellules de l'ectoderme en cellules du neurectoderme. On retrouve au niveau du mésoderme une structure nommée notochorde (Figure 1). Cette structure située sur la ligne médiane de l'embryon est formée d'une couche interne et d'un épithélium externe. La couche interne est composée de cellules remplies de vacuoles, tandis que l'épithélium externe est formé de cellules sécrétant une substance épaisse produisant une matrice extracellulaire. La notochorde sécrète des facteurs de croissance qui permettent la différenciation des cellules avoisinantes (11). Un des facteurs de croissance, *Sonic Hedgehog (Shh)*, est sécrété dans la région apicale de la notochorde. Ce facteur se lie au récepteur PTCH1 et permet l'initiation de voies de signalisation importantes pour la différenciation cellulaire (12). De plus, les protéines BMP4 et FGF sont aussi essentielles à la différenciation cellulaire. Cette différenciation est induite par l'expression de plusieurs molécules comme Sox2, Tbx6 et Zfp521 qui permettent le

développement d'une lignée de cellules neuronales et SIP1, qui active plusieurs voies de signalisation essentielles pour la formation du tube neural (13).

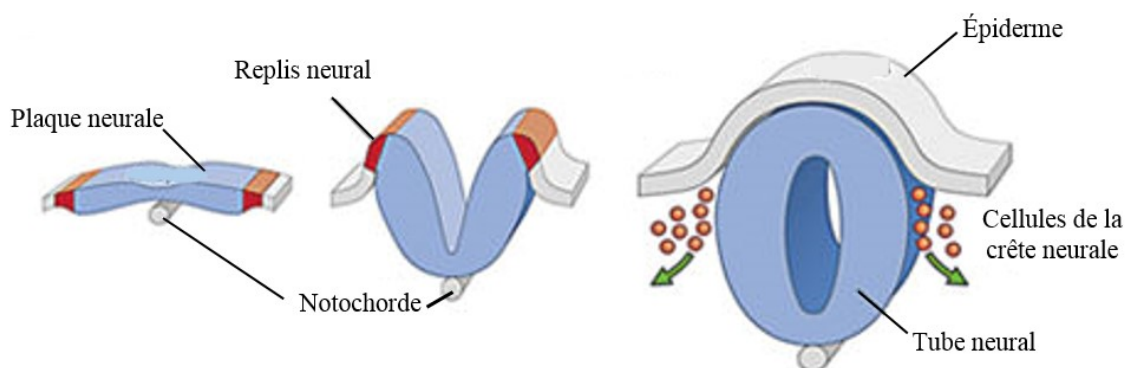


Figure 1 : Schématisation de la neurulation. Ce schéma présente la formation de la plaque neurale induite par la notochorde, puis la formation des replis neurales qui fusionnent pour former le tube neural. Figure tirée de (14)

La formation de la plaque neurale est un processus complexe comprenant plusieurs étapes permettant le rétrécissement médio-latéral et l'extension rostro-caudale du tube neural suivant l'axe de l'embryon (12). Ce rétrécissement, aussi appelé extension convergente, est le résultat de l'activation du processus de polarité cellulaire planaire (PCP), soit la signalisation requise pour coordonner la polarisation des cellules dans le plan tissulaire (15). Cette polarisation passe par la voie non-canonique de Wnt. Dans cette voie, le récepteur Frizzled associé à la protéine Dvl vient activer RhoA/ROCK et entraîne l'activation de la myosine II. En même temps, il y a recrutement du complexe Vangl2/Prickle au niveau des jonctions cellulaires, permettant l'activation de la voie PCP dans la cellule avoisinante (15). L'activation de cette voie permet une migration collective et une bonne organisation des cellules, une division orientée des cellules ainsi que l'extension convergente et la constriction apicale (15). L'activation de toutes ces protéines permet le changement de forme des cellules du neurectoderme, passant de rondes à allongées (14). Ce changement est aussi facilité par une baisse d'expression de molécules d'adhésion, permettant de séparer les cellules du neurectoderme des cellules de l'ectoderme. Cette baisse de transcription est induite par l'expression des facteurs de transcription *Slug* et

Snail (16). La différenciation des cellules du neurectoderme produit une surélévation linéaire du tissu en forme de ligne au milieu du disque, créant ainsi la plaque neurale (Figure 1).

Il y a ensuite la formation de replis neuraux causés par l'expansion de l'épiderme de chaque côté de la plaque neurale (Figure 1). Cette expansion crée une pression sur la plaque neurale qui résulte en l'élévation de l'ectoderme de part et d'autre de celle-ci. L'expression du facteur *Shh* par la notochorde et de la BMP4 par le toit de la plaque neurale induit la différenciation des cellules de la gouttière neurale (16). Ces cellules seront capables de sécréter *Shh* et BMP4 afin de différencier les cellules avoisinantes. Les replis neuraux fusionnent progressivement à la face dorsale, entraînant la formation du tube neural (Figure 1). Cette fusion se produit selon un gradient postéro-antérieur au niveau de ce qui deviendra l'encéphale, et selon un gradient antéro-postérieur, au niveau de la moelle épinière (10).

À la suite de la fusion des replis neuraux, il y a une étape de prolifération cellulaire. Les cellules progénitrices vont tout d'abord se diviser de façon symétrique, donnant naissance à deux cellules progénitrices, puis vont se diviser de façon asymétrique pour donner naissance à un neuroblaste et à une cellule progénitrice. Le cycle de prolifération se termine par le retour à la division symétrique pour donner naissance cette fois à deux neuroblastes. Une fois produits, les neuroblastes vont migrer vers leur emplacement spécifique dans l'encéphale. Cette migration diffère selon le type cellulaire et est fortement régulée, tant de façon intracellulaire par l'expression de plusieurs protéines, que de façon extracellulaire par des chimiokines qui vont diriger cette migration. Nous reviendrons plus bas sur les facteurs régulant la migration des INs corticaux. Une fois la destination atteinte, les cellules vont se différencier en sous-types neuronaux spécifiques. Cette différenciation est prédéterminée génétiquement avant le début de la migration et est essentielle pour que les cellules acquièrent leurs propriétés fonctionnelles matures (10).

Enfin, le développement du SNC se termine avec la synaptogenèse. C'est dans cette étape que les neurones vont former différentes connexions neuronales. La synaptogenèse commence dans le développement postnatal (10). La synaptogenèse permet l'élaboration de circuits corticaux et l'organisation de la communication entre les différentes structures cérébrales soutenant les fonctions cérébrales matures.

2- Origines et diversité des interneurons GABAergiques corticaux

La section précédente énonce les grands principes du développement cérébral. Cependant, le cerveau est composé d'une grande diversité de types cellulaires et certaines voies signalétiques sont spécifiques à certains types neuronaux. Ainsi, au niveau cortical, on retrouve des neurones excitateurs, aussi appelés cellules pyramidales, qui relâchent du glutamate et des neurones inhibiteurs, dits interneurons GABAergiques (INs), qui relâchent de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) (17). Ces deux classes de neurones coexistent et forment un équilibre fragile qui, lorsqu'il est perturbé, mène à des troubles neuropsychiatriques, tels la schizophrénie ou à des désordres neurologiques graves, telles les encéphalopathies épileptogènes (8, 18) . D'autres types neuronaux sécrétant la sérotonine, la dopamine ou l'acétylcholine jouent un rôle de neuromodulateurs en modulant l'excitabilité ou la transmission synaptique des neurones pyramidaux et des INs. Les INs sont peu abondants dans le cortex, représentant environ 20-30% des neurones corticaux. De ce fait, un défaut de migration des INs pourrait passer inaperçu en IRM, mais ceci altérerait l'équilibre entre excitation et inhibition et pourrait mener à des maladies neurologiques graves, incluant l'épilepsie (17).

Il existe des différences majeures entre les cellules pyramidales et les INs dès l'âge embryonnaire. De fait, les cellules pyramidales sont produites par les neuroblastes du toit du ventricule, ou pallium, et vont coloniser les différentes couches du cortex par un processus de migration radiale. Cependant, les neuroblastes donnant naissance aux INs proviennent du subpallium, c'est-à-dire du plancher ventriculaire. Le subpallium peut être divisé en 5 grandes zones de prolifération : l'éminence ganglionnaire caudale (CGE), l'éminence ganglionnaire médiane (MGE), l'éminence ganglionnaire latérale (LGE), l'aire préoptique (POa) et l'ébauche septale. Les neurones migrent de ces zones de prolifération vers les différentes structures cérébrales.

Les INs sont hétérogènes et peuvent être divisés selon leurs caractéristiques biochimiques, leurs caractéristiques physiologiques et leur connectivité, ce qui leur confère des rôles distincts au sein des circuits corticaux (8, 17, 19-23). Une part de cette hétérogénéité fonctionnelle est attribuable à une spécification précoce des INs provenant de régions progénitrices différentes, soumis à des programmes moléculaires spécifiques et exposés à des gradients de morphogènes

différents (8, 17). Ainsi, au niveau du cortex, environ 60% des INs proviennent de la MGE et incluent les neurones exprimant la parvalbumine (PV) et ceux exprimant la somatostatine (SST). La CGE contribue environ 30% des interneurones corticaux, incluant les INs exprimant le peptide vasoactif intestinal (VIP), la calrétinine (CR) ou la reeline. La POa contribue environ 10% des INs corticaux, incluant les neurones exprimant le neuropeptide Y (17, 23) (Figure 2).

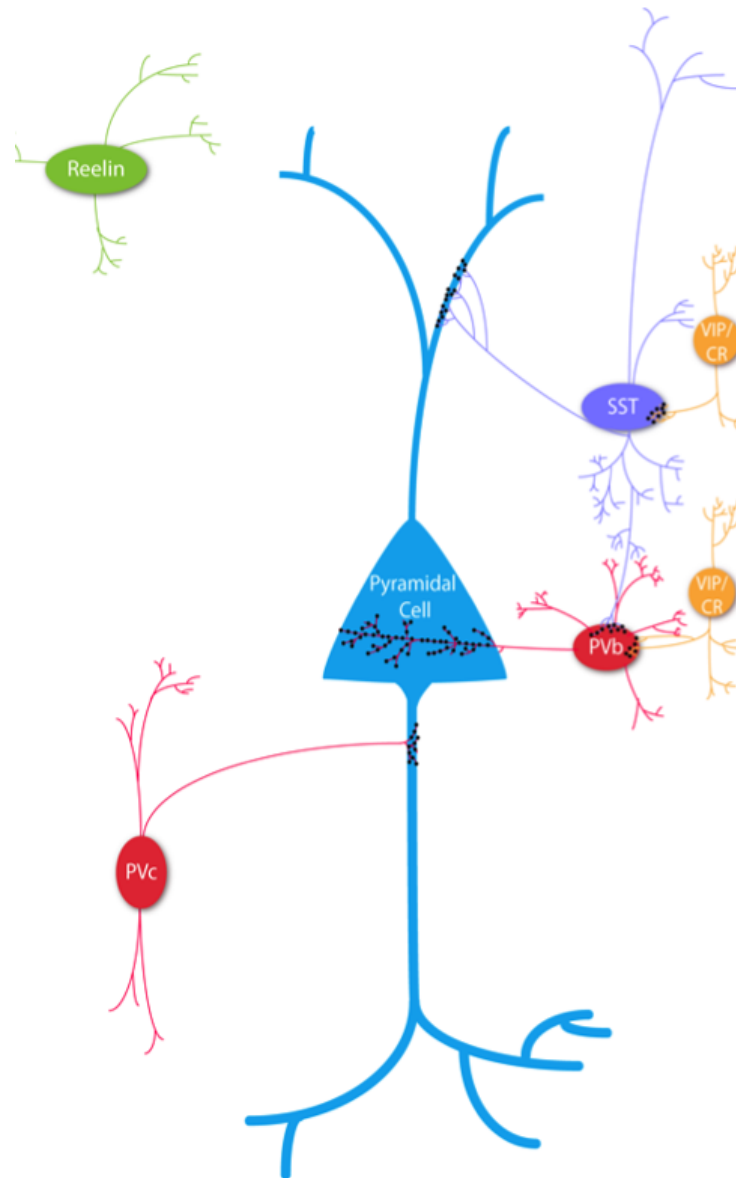


Figure 2 : Diversité des interneurons GABAergiques corticaux. Les interneurons en panier exprimant la parvalbumine (PVb, rouge) ciblent le corps cellulaire des cellules pyramidales (bleu). Les cellules en chandelier, exprimant aussi la PV (PVc, rouge), ciblent le segment initial de l'axone. Les interneurons exprimant la somatostatine (SST, mauve) ciblent les dendrites distales des cellules pyramidales. Les interneurons bipolaires, exprimant la calrétinine et le peptide vasoactif intestinal (VIP/CR, jaune) ciblent d'autres INs. Les cellules névrogliiformes (vert) expriment la Reeline et relâchent des nuages de GABA extra-synaptique. Figure originale.

La spécification des INs est dictée par l'expression successive de plusieurs facteurs de transcription. Le facteur de transcription *Dlx5/6* est un des facteurs de transcription essentiels à la production, la spécification et la migration de tous les INs et est exprimé de façon assez précoce dans le développement neuronal, vers E11,0 dans la zone sous-ventriculaire de la MGE et de la LGE chez la souris (24-28). Ainsi, les souris *Dlx5/6*^{-/-} ont un nombre réduit d'INs tant au niveau cortical qu'au niveau des bulbes olfactifs et présentent une épilepsie précoce, confirmant l'importance des INs dans la régulation de l'excitabilité corticale (29, 30). De plus, chaque région progénitrice exprime des facteurs de transcription spécifiques permettant la génération de sous-types d'INs, tels que détaillés ci-dessous.

a. MGE :

Les interneurons corticaux proviennent principalement de la MGE. Ils peuvent être divisés en 2 grandes catégories, soit les INs exprimant la parvalbumine (PV) et les INs exprimant la somatostatine (SST) (31) (Figure 2). Au niveau du cortex, les INs n'expriment que l'un ou l'autre de ces marqueurs.

Les INs provenant de la MGE expriment le facteur de transcription *Nkx2.1* vers E12,5. L'ablation de *Nkx2.1* cause une mauvaise spécification des INs de la MGE en sous-types typiques de la CGE. Ainsi, chez les souris *Olig2*^{Cre-ER};*Nkx2.1*^{loxP/-}, il y a une nette diminution du nombre de cellules corticales marquées par la PV ou la SST et un gain de cellules exprimant la VIP ou la CR (32). L'activation du facteur de transcription *Nkx2.1* permet la transcription d'autres facteurs de transcription de façon séquentielle, soit *Lhx6*, puis *Sox6*. *Lhx6* est exprimé de façon soutenue par les INs de la MGE dès leur sortie de la zone sous-ventriculaire. Ce facteur de transcription est important pour la régulation de la transcription de plusieurs gènes, tels *ErbB4*, *Cxcr4*, *Cxcr7*, *Arx* et *Npas1* (33, 34). La perte de fonction de *Lhx6* cause une perturbation de la migration des INs provenant de la MGE (35, 36). Comme de fait, la perte d'expression de *Lhx6* mène à une migration des INs principalement dans la zone intermédiaire et dans la zone sous-ventriculaire de la plaque corticale, résultant en une nette diminution du nombre et en un positionnement aberrant des INs exprimant la PV ou la SST qui s'agglutinent dans les couches superficielles (I-II) ou profondes (VI) (34). Enfin, *Sox6* est aussi important

pour la migration des cellules PV. Une perte de fonction de *Sox6* cause un phénotype semblable à la perte de fonction de *Lhx6*, soit une spécification correcte des INs provenant de la MGE, mais une migration et une maturation anormale des cellules PV (37).

Les sous-types d'INs issus du MGE ont des propriétés et des fonctions distinctes et incluent :

Cellules PV : Les cellules PV sont les cellules inhibitrices les plus abondantes du cortex. Elles représentent environ 40% des INs corticaux. Il existe deux types de cellules PV, soit les cellules en panier et les cellules en chandelier qui peuvent être encore divisées selon leur morphologie et leurs caractéristiques de relâche synaptique (8, 23, 31, 38). Une source importante d'inhibition du cortex provient des cellules en paniers. Ces cellules ciblent les dendrites proximales ainsi que le soma des cellules pyramidales. Elles ont un patron de décharge rapide causé par l'expression du canal potassique Kv3.1 qui permet la repolarisation rapide de la cellule (8, 23, 39-41). Les INs PV en panier génèrent une inhibition anticipée (« feed-forward ») des circuits corticaux, créant ainsi des fenêtres temporelles restreintes durant lesquelles les cellules pyramidales peuvent être excitées, soit par les afférences thalamiques, soit par les projections intra-corticales. En plus d'être importantes pour la balance inhibition/excitation, ces cellules sont essentielles au maintien de certains rythmes corticaux, telles les oscillations gamma. Ces oscillations sont importantes pour soutenir les processus attentionnels et la mémoire (8, 23, 42-44).

De leur côté, les cellules en chandelier exprimant la PV ciblent le segment initial de l'axone des cellules pyramidales (Figure 2). Une hypothèse intéressante mentionne que ces cellules à relâche rapide pourraient à la fois causer la dépolarisation des cellules pyramidales et leur hyperpolarisation (45, 46). Ces cellules sont encore peu connues. Cependant, tout comme les cellules en paniers, il a été émis qu'elles pourraient être l'interrupteur du circuit cortical. En effet, entre 35 et 50% des cellules pyramidales du cortex somatosensitif de la souris sont ciblées par les cellules en chandelier (8, 23, 47-49).

Cellules SST : Environ 30% des INs corticaux expriment la SST (17). Ces cellules sont majoritairement des cellules de Martinotti. Ce type de cellules cible les dendrites des cellules pyramidales en projetant leurs axones vers la première couche du cortex (Figure 2). Leur corps cellulaire se retrouve principalement dans la couche V, mais peut aussi être

présent dans les couches II à IV (50, 51). Une fois activée, ces cellules ont souvent une décharge initiale phasique (« burst »), suivie d'un patron de décharge adaptatif (51). Au niveau du cortex, il existe d'autres types de cellules SST dites non-Martinotti, telles les cellules X94. Ces cellules ont des seuils et des taux de décharge généralement plus élevés que les cellules de Martinotti et diffèrent de celles-ci par leur morphologie et leur localisation (52).

b. CGE :

Environ 30% des INs corticaux proviennent de la CGE. Ces cellules expriment le marqueur 5Ht3aR, un récepteur membranaire sérotoninergique unique aux INs de la CGE (53). La CGE donne naissance à plusieurs sous-classes d'INs. On retrouve les cellules neurogliaformes (Ngf), exprimant la reeline, les cellules bipolaires, exprimant la CR et le peptide vasointestinal (VIP), et les cellules multipolaires, exprimant le NPY et la reeline (8, 17, 54). La majorité des INs corticaux provenant de la CGE exprime le VIP (environ 40%) et colonise les couches II et III du cortex (8, 55). Ces cellules font des synapses sur le soma et les dendrites des cellules pyramidales, ainsi que sur certains INs des couches profondes du cortex, incluant les INs à PV ou à SST (Figure 2). Ces INs VIP sont donc uniques puisqu'ils causent une inhibition des cellules inhibitrices, soit une désinhibition corticale, critique aux processus corticaux (56-58). De façon différente, les cellules neurogliaformes relâchent des nuages de GABA qui ciblent à la fois les cellules pyramidales et les INs (59). La différenciation des INs provenant de la CGE est régulée par les facteurs de transcription *Couptf2* (60) et *Prox1* (61).

c. POa :

Finalement, une faible quantité des interneurons corticaux provient de la POa. Ces INs expriment aussi le facteur de transcription *Nkx2.1*, mais cette expression ne mène pas à l'expression du facteur de transcription *Lhx6* (17). La POa produit des cellules multipolaires NPY. Ces INs ont un patron de décharge rapide avec adaptation. On retrouve aussi des cellules de Martinotti qui expriment la SST et des cellules PV en paniers. On reconnaît les INs de la

POa par l'expression de récepteurs membranaires différents, tel le récepteur à sérotonine 5HT3a qui est absent chez les INs de la MGE (17). Ces INs sont encore peu connus et il reste beaucoup à apprendre sur leurs fonctions et leurs mécanismes de migration.

3- Migration des INs corticaux

Les INs corticaux migrent de façon tangentielle, c'est-à-dire parallèlement à la surface du ventricule, pour atteindre la plaque corticale. Puis, ils utilisent la migration radiale, perpendiculaire à la surface du ventricule, pour coloniser la plaque corticale. Ce motif de migration diffère de celui des cellules pyramidales, qui migrent uniquement de façon radiale, c'est-à-dire de façon perpendiculaire à la surface du ventricule, en s'attachant à la fibre gliale radiale (17, 62).

La migration tangentielle se fait en plusieurs étapes qui seront décrites ci-dessous (Figure 3).

a. Activation de la migration.

L'activation de la migration est la première étape de la migration des INs. Les neuroblastes formés à la suite de la division mitotique des cellules progénitrices devront être activés pour pouvoir se déplacer dans l'encéphale. L'activation est l'étape qui mène à la polarisation de la cellule, c'est-à-dire à la formation d'un gradient postéro-antérieur de molécules dans le cytosol de la cellule et à la répartition non uniforme de récepteurs à la surface membranaire. Cela va permettre à la cellule de répondre de façon asymétrique aux signaux extracellulaires (63-65). Ainsi, une fois polarisée, la cellule sera capable de sentir et de suivre les gradients de molécules chimioattractives.

L'activation des INs requiert à la fois l'expression de récepteurs à la membrane cellulaire et l'expression de molécules dans l'environnement. De façon précoce, les INs expriment les récepteurs Robo et éphrine A5 (Efr) uniformément à la surface membranaire. La liaison des facteurs chimiorépulsifs Slit et EfnA5, présents dans le MGE, à leurs récepteurs respectifs Robo et Eph-A5 cause la polarisation des INs (17, 66, 67).

D'autres facteurs favorisent aussi la migration des INs. Plusieurs facteurs de croissance sont des facteurs motogènes importants pour l'activation de la migration tangentielle. Un de ces facteurs présents dans les zones de prolifération est l'*hepatocyte growth factor/scatter factor* (facteur de croissance des hépatocytes/facteur de dispersion) (HGF/SF). Ce facteur, liant le récepteur MET, augmente la motilité de plusieurs types de cellules dont les INs. Les souris incapables d'activer ce facteur présentent un nombre réduit d'INs dans le cortex préfrontal. De plus, un excès de ce facteur pourrait aussi perturber la migration des INs et son niveau doit donc être régulé étroitement (68, 69).

Le *Glial cell line-derived neurotrophic factor* (facteur de croissance dérivé d'une lignée de cellules gliales) (GDNF) est un agent chimioattractif important pour la migration des INs par sa liaison à son récepteur GRF α 1 exprimé sur les INs en migration (70-72). L'activation du récepteur GRF α 1 stimulerait la croissance de neurites, nécessaire à la migration des interneurons (72). Les souris mutantes pour le récepteur GRF α 1 ont une diminution du nombre d'INs corticaux. Ces souris, en plus de présenter une sensibilité plus élevée aux crises épileptiques, ont un déficit d'interaction sociale (72).

Un des facteurs de croissance les plus étudiés dans la migration des INs est le *brain-derived neurotrophic factor* (facteur neurotrophique dérivé du cerveau) (BDNF). Ce facteur fait partie de la famille des neurotrophines et se lie au récepteur à tyrosine kinase TrkB exprimé par les INs. Les souris déficientes en TrkB ont une diminution du nombre d'INs corticaux (73). Cependant, cette diminution pourrait être causée par une diminution de l'expression de marqueurs tels la calbindine par les INs autant que par une mauvaise migration de INs (74). Le BDNF est important pour l'expression de la reeline par les cellules de Cajal-Retzius. L'expression de la reeline permet la bonne distribution des cellules Cajal-Retzius et permet la migration des INs dans la zone marginale du cortex (75). De plus, le BDNF serait présent en quantité constante tout au long du trajet de migration des INs, en particulier dans la zone sous-ventriculaire et dans les bulbes olfactifs. BDNF facilite la migration des INs par sa liaison au récepteur TrkB qui active le cAMP response element-binding protein (CREB) et induit l'activation de la voie PI3K et MAPK, produisant les changements morphologiques cellulaires requis pour la réponse des INs au gradient de chimiokines du milieu extracellulaire (76, 77).

De plus, très tôt dans le développement, les neuroblastes expriment les récepteurs GABA_A et AMPA/NMDA. De façon intéressante, à cette étape du développement, la liaison du GABA au récepteur GABA_A et la liaison du glutamate au récepteur AMPA/NMDA causent la dépolarisation de la membrane plasmique, qui induit l'ouverture des canaux calciques voltage-sensibles (VSCC) et ainsi, l'entrée de calcium dans la cellule (78). L'augmentation de calcium intracellulaire stimule la motilité des INs (79). Ces neurotransmetteurs sont donc essentiels à l'activation de la migration.

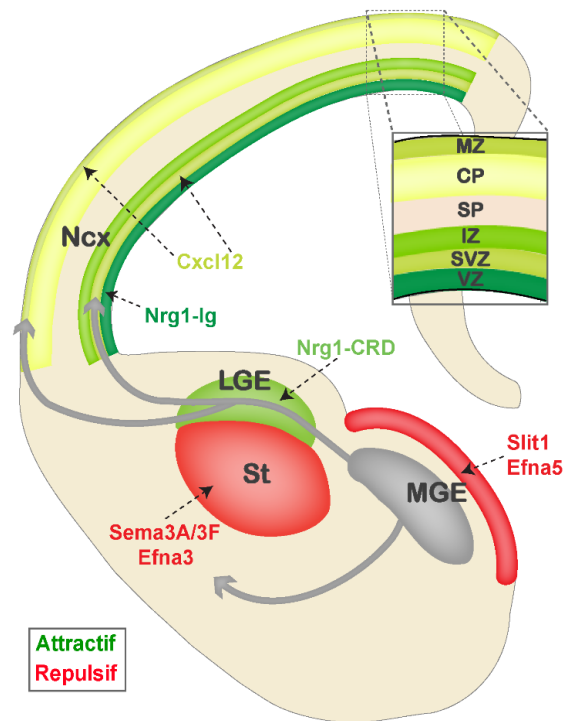


Figure 3. Schématisation de la migration des interneurons corticaux. La migration des interneurons GABAergiques corticaux (INs) est un processus qui implique une grande quantité de molécules, tel que décrit dans le texte. MGE : éminence ganglionnaire médiane, LGE : éminence ganglionnaire latérale, St : striatum, Ncx : plaque corticale, MZ : zone marginale, CP : plaque corticale, SP : sous-plaque, IZ : zone intermédiaire, SVZ : zone sous-ventriculaire, VZ : zone ventriculaire. Figure originale.

b. Migration vers la plaque corticale

Une fois la migration activée, les INs commencent leur migration jusqu'à la plaque corticale en suivant une route parallèle à la surface du ventricule. Cette migration est guidée par un gradient de molécules chimioattractives comme le BDNF et de molécules chimirépulsives telles les *Slit* et les Eph (17, 66, 67). Durant cette migration, les INs évitent systématiquement le striatum et le POa. Le striatum exprime les chimiokines répulsives sémaphorines 3A et 3F. Ces molécules se lient aux récepteurs plexine (PLXR) ou aux récepteurs neuropiline (NRP) présents à la surface des INs. Un défaut dans la cascade de signalisation induite par la liaison de ces sémaphorines aux PLXR attire les INs dans le striatum, ce qui entraîne une mauvaise migration des INs en prévenant leur migration vers la plaque corticale (80). De plus, l'expression des sémaphorines est restreinte au striatum par la présence de protéoglycanes à chondroïtine sulfate qui lient la sémaphorine 3A, empêchant sa diffusion hors du striatum (81). Cette liaison augmente l'effet répulsif de la sémaphorine 3A, empêchant ainsi l'entrée des INs dans le striatum (81). L'expression du récepteur Robo à la surface des INs pourrait aussi jouer un rôle dans l'évitement du striatum. Cependant, le mécanisme n'impliquerait pas les *Slit* (82, 83). Les mécanismes permettant aux INs d'éviter la POa sont encore inconnus à ce jour.

La neureguline-1 (Nrg1) est une autre chimiokine qui permet de guider les INs jusqu'au néocortex. Cette chimiokine lie le récepteur ErbB4 présent à la surface membranaire des INs, ce qui aide les INs à migrer au travers de la LGE (84). En plus de permettre aux INs de suivre la bonne route migratoire, Nrg1 permet l'extension du neurite rostral par l'activation de la voie ROCK et promeut la migration des INs (85).

c. Voies de migration tangentielle

À ce stade embryonnaire, la plaque corticale est une structure laminaire composée de 6 couches : la zone ventriculaire (VZ), la zone sous-ventriculaire (SVZ), la zone intermédiaire (IZ), la sous-plaque (SP), la plaque corticale (PC) et la zone marginale (MZ). Les INs peuvent emprunter 2 routes migratoires pour migrer dans le néocortex (17, 86-89). La première route est appelée la route superficielle et passe dans la MZ. Les INs qui migrent dans la MZ se dirigent dans toutes les directions et se dispersent de façon homogène dans le cortex (86-88). La

deuxième route, la route profonde, se fait dans la SVZ. Les INs qui suivent cette route colonisent le cortex selon un gradient latéromédian. Finalement, une petite minorité d'INs migre dans la SP. Cependant, les INs évitent de migrer dans les autres couches du néocortex, tout particulièrement dans la CP. En effet, la migration à travers ces routes est régulée par l'expression de la chimiokine attractive Cxcl12 dans la MZ et dans la SVZ (90, 91). Les INs expriment les récepteurs Cxcr4 et 7 qui lient Cxcl12. Ce signal est tellement fort qu'il permet aux INs d'emprunter strictement ces voies de migration, malgré la présence de chimiokines dans les différentes couches de la plaque corticale (18, 91, 92). La perte de l'expression de Cxcl12 est létale, ce qui montre l'importance de ce mécanisme (18). De plus, la perte des récepteurs Cxcr4 et 7 cause une invasion prématurée des INs dans la PC et ainsi, une mauvaise distribution laminaire finale des INs dans le cortex (18, 92). Une mauvaise distribution laminaire, même subtile, peut mener à un déséquilibre du ratio inhibition/excitation essentiel au bon fonctionnement de l'encéphale (18).

d. Transition vers la migration radiale

Une fois arrivés à la plaque corticale, les INs passent d'un mode de migration tangentielle à une migration radiale, c'est-à-dire une migration perpendiculaire à la surface des ventricules qui est aidée par l'interaction des cellules avec la fibre gliale radiale. À cette étape de la migration, les INs cessent d'exprimer les récepteurs membranaires Cxcr4 et Cxcr7 (18). Ainsi, les cellules ne seront plus soumises à l'effet attractif de la chimiokine Cxcl12 exprimée dans la SVZ et dans la MZ et pourront envahir la plaque corticale. De plus, les INs commencent à exprimer la connexine 43, ce qui favorise leur interaction avec la fibre gliale, par la formation de jonctions communicante (GAP-junction) (93). Une des hypothèses est que la plaque corticale contient des molécules chimioattractives non-décrites. Le signal de ces molécules est camouflé par le signal des récepteurs Cxcr4 et 7 (18). La perte de ces récepteurs permet aux INs d'être attirés dans la CP.

e. Allocation laminaire

L'allocation laminaire est l'étape de la migration des INs durant laquelle ils atteignent leur position finale au sein de couches spécifiques du néocortex. Chez la souris, cette étape a généralement lieu dans les premiers jours postnataux (94). Il existe peu de données sur les mécanismes régulant cette étape. Une des hypothèses est que les projections des cellules pyramidales des couches II, III et V du néocortex interagiraient avec les INs pour les attirer dans la bonne couche du cortex et pour les aider à arrêter leur migration (95). De plus, les différentes sous-populations d'INs seraient guidées par différents types de projections neuronales. Par exemple, les projections des cellules pyramidales des couches profondes exprimant le facteur de transcription *Fzf2* guideraient les INs PV et SST vers leur position finale dans le cortex (95). Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'arrêt prématuré de la maturation des cellules pyramidales mène à un défaut dans l'allocation laminaire des INs (95). De plus, les cellules pyramidales migrent de façon radiaire et colonisent le cortex des couches profondes aux couches superficielles. Ainsi, les neurones produits en premier se localisent dans les couches profondes, tandis que ceux produits plus tard se localisent dans les couches superficielles. Contrairement aux cellules pyramidales, les INs de la MGE colonisent tout d'abord les couches profondes et les INs du CGE vont coloniser les couches superficielles à partir de E12,0, pour finir avec la colonisation de la PC vers P1 chez la souris (96).

f. Arrêt de la migration

L'arrêt de la migration est la dernière étape de la migration des INs. Elle se produit dans les premiers jours postnataux chez la souris. De façon intéressante, cet arrêt n'est pas lié à la naissance des INs, c'est-à-dire qu'un IN ayant commencé sa migration avant un autre peut arrêter de migrer après celui-ci. L'arrêt de migration corrèle avec l'expression du transporteur K^+/Cl^- *KCC2* (78). Cet échangeur est essentiel aux INs puisqu'il modifie l'effet de la liaison du GABA à son récepteur $GABA_A$. Puisque les récepteurs $GABA_A$ sont des récepteurs ionotropiques, donc dépendants de l'équilibre ionique de la cellule, ils permettent le passage d'ions Cl^- selon son gradient de concentration dans la cellule (78). Avant l'expression de l'échangeur *KCC2* à la surface membranaire des INs, la liaison du GABA à son récepteur

entraîne une sortie massive du Cl^- , causant consécutivement la dépolarisation de la membrane, l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants (VSCC) et l'entrée de calcium dans la cellule (78). Cependant, l'expression de l'échangeur KCC2 modifie l'équilibre ionique des INs, puisqu'il force la sortie des ions Cl^- de la cellule. La liaison du GABA avec son récepteur va donc permettre l'entrée de Cl^- dans la cellule, ce qui induit une hyperpolarisation de la membrane et l'inhibition de la cellule. L'expression de l'échangeur KCC2 permet donc la transition de l'effet du GABA d'excitateur à inhibiteur avec la maturation cellulaire (78). Le GABA joue ainsi un rôle de frein à la migration des INs lorsque ceux-ci sont plus matures. Ce GABA ambiant est sécrété de façon non-synaptique par les INs en migration. De plus, on note une diminution du glutamate ambiant dans les premiers jours postnataux causée par la régulation positive des récepteurs à glutamate présents sur les astrocytes, ce qui permet une recapture du glutamate du milieu extracellulaire par les astrocytes matures (78). Puisque le glutamate favorise l'activation des récepteurs AMPA/NMDA qui entraîne l'ouverture des VGCC et une entrée massive de calcium, une diminution du glutamate ambiant diminue l'entrée de calcium cellulaire, retirant ainsi un facteur pro-motogène. Dans les cellules pyramidales, l'entrée de calcium favorise la motilité par l'activation des connexines 26 et 43 (97). Le rôle du calcium dans les INs n'est pas encore élucidé. Cependant, il est clair qu'une baisse de calcium intracellulaire entraîne l'arrêt de la migration des INs (78).

4- Dynamique du cytosquelette

Les INs diffèrent des cellules pyramidales dans plusieurs aspects de leur migration. La dynamique du cytosquelette des INs est différente de celle des cellules pyramidales. Dans cette section, les mécanismes intracellulaires menant à la réorganisation du cytosquelette des INs permettant leur migration seront expliqués.

Les INs utilisent plusieurs mécanismes pour se déplacer dans le milieu extracellulaire afin de suivre leur route migratoire et d'atteindre la plaque corticale. Ces mécanismes induisent le remodelage rapide du cytosquelette par la succession de trois mouvements, soit l'extension du neurite rostral, la nucléokinèse et la rétraction du neurite caudal (62, 98, 99). Ceci implique

deux composantes majeures du cytosquelette : les filaments d'actine (F-actine) et les microtubules (MTs) (Figure 4).

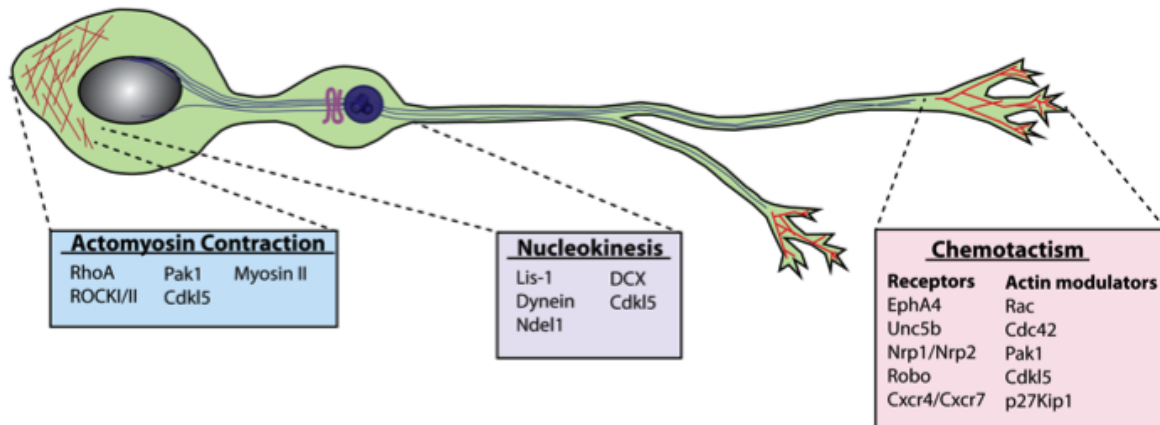


Figure 4 : Dynamique du cytosquelette d'un interneurone en migration. Schématisation d'un interneurone en migration et des protéines impliquées dans cette migration. Figure originale.

a. Extension et branchement du neurite rostral

L'extension du neurite rostral est la première étape du mouvement. Ce neurite est formé de plusieurs structures. Tout d'abord, les INs forment un cône de croissance (100). Le cône de croissance permet aux INs de mieux suivre le gradient de chimiokines, puisqu'il contient des récepteurs lui permettant de percevoir l'environnement. Ce cône est constitué de filopodes qui sont des petites extensions longues et minces créées par la polymérisation de la F-actine (101, 102). Les cônes de croissance comportent aussi des lamellipodes, des extensions plus longues, plus larges et plus solides de la membrane cellulaire (101, 102). Ainsi, le lamellipode se rétracte moins rapidement que les filopodes, situés au bout des lamellipodes, et sera plus facilement stabilisé (101, 102). Le cône de croissance exprime plusieurs types de récepteurs membranaires permettant à la cellule de percevoir l'environnement et de suivre un gradient chimiotactile. Chez les INs, il existe une grande variété de récepteurs. Tout d'abord, il y a les récepteurs Robo, Efr

et NRP qui lient des chimiokines répulsives (17, 66, 67). Leur activation induit une déstabilisation de la F-actine. Les récepteurs MET, GRF α et TrkB lient les différents facteurs de croissance mentionnés plus haut, favorisant la stabilisation du neurite rostral (103). Finalement, les récepteurs Cxcr4 et Cxcr7 qui lient la chimiokine Cxcl12 permettent aussi la stabilisation du neurite rostral (17, 66, 67). Les récepteurs Cxcr4 et Cxcr7 sont des récepteurs couplés aux protéines G. Ainsi, une fois activés par la liaison d'une chimiokine, ces récepteurs permettent l'activation de petites protéines G, telles les Rho-GTPases (102). Les Rho-GTPases ont une conformation inactive lorsqu'elles sont liées à la GDP et une conformation active lorsqu'elles lient la GTP. L'activation de ces protéines implique donc l'échange de la GDP pour une GTP, catalysé par la sous-unité α des protéines G (104, 105). D'autres récepteurs, comme les Efr, sont des récepteurs à tyrosine kinase, c'est-à-dire qu'ils ont une activité tyrosine kinase leur permettant de transférer un groupement phosphate sur une protéine, permettant son activation (106). Tous ces types de récepteur permettent l'activation de protéines induisant le remodelage du cytosquelette.

On retrouve trois GTPases principales impliquées dans le remodelage de l'actine, soit Cdc42 et Rac1 au niveau du pôle antérieur des INs et RhoA au pôle postérieur et à l'avant du noyau des INs (62, 99, 101, 102).

Une fois liés aux GTP, Cdc42 et Rac-1 activent le complexe Wasp/WAVE qui active à son tour la protéine Arp2/3. Arp2/3 est très importante dans les INs, puisqu'elle permet, avec la cortactine, la formation de protrusions au niveau du neurite rostral par la formation de branches de F-actine à un angle de 70° (100). Ces protrusions peuvent être stabilisées par la formation de filaments de MTs, ce qui permet la formation de branches. Ce processus est essentiel, puisqu'il permet aux INs de suivre les gradients chimiotactiles, en formant des branches dans la direction où se trouve la plus grande concentration de facteurs chimioattractifs. Ainsi, dans ces INs, le cône de croissance, avec tous les récepteurs qui y trouvent, est essentiel pour permettre la bonne orientation initiale du neurite rostral, qui se divise par la suite en plusieurs branches pour une orientation plus fine de l'IN (85). La migration se fait ensuite par la stabilisation de la branche la mieux orientée par rapport au gradient de chimiokines via la signalisation de la voie Rho-ROCK (85). De plus, le complexe Wasp/Wave permet aussi

l'activation de ROCK qui phosphoryle et active la profiline. La profiline est située dans les filopodes et permet la nucléation de la F-actine.

L'élongation du neurite rostral est régulée par Disc1. Cette protéine s'associe à la Girdine au niveau du cône de croissance et permet ainsi la nucléation de la F-actines. La baisse d'expression de DISC1 entraîne une baisse de F-actine dans le cône de croissance des INs en migration, ce qui altère leur migration (107).

b. Nucléokinèse

Une fois la branche principale stabilisée, les INs entrent dans la phase de la nucléokinèse, soit le mouvement du noyau vers l'avant. La nucléokinèse se fait en 3 mouvements (62, 99). Tout d'abord, le centrosome est déplacé vers l'avant. Pour ce faire, il y a un gonflement dans le neurite rostral. Le centrosome ainsi que d'autres organelles comme le Golgi se déplacent ensuite dans ce gonflement, ce qui stabilise le neurite rostral (99). À ce stade, le noyau est entouré d'une cage de MTs connectés au centrosome (108, 109). Plusieurs protéines sont impliquées dans le mouvement du noyau. La protéine double-cortine (DCX) permet la stabilisation du réseau de MTs essentiel à la nucléokinèse, en se liant aux MTs au niveau du noyau et au niveau du centrosome. Cette protéine permet au MTs de rester fermement accrochés au noyau, malgré la force exercée durant la nucléokinèse. Ainsi, les neurones déficients en DCX ne sont pas capables de déplacer leur noyau (109, 110). La protéine Lis1 permet aussi aux MTs de rester attachés au noyau. L'ablation de Lis1 réduit la migration des INs (111). Le réseau de MTs est très important pour une bonne nucléokinèse, mais n'est pas essentiel. Comme de fait, la déstabilisation du réseau de MTs cause une réduction de la nucléokinèse, mais ne l'abolit pas complètement (112).

En plus d'être tiré vers l'avant par le réseau de MTs, le noyau est poussé vers l'avant par le réseau d'acto-myosine situé à l'arrière de la cellule. Les myosines sont des moteurs cellulaires qui lient les filaments d'actine. Ainsi, la myosine IIb est composée d'une chaîne lourde, d'une chaîne légère et d'une tête motrice ATPase. Elle dimérise en se liant de façon inverse à deux filaments d'actine (110). En hydrolysant l'ATP, la myosine va changer de conformation, ce qui lui permet d'avancer sur les filaments d'actine. Puisqu'elle se lie de façon inverse à deux

filaments d'actine, ce mouvement permet une contraction du réseau d'actine et ainsi le mouvement du noyau vers l'avant (100).

Cdc42 et Rac1 sont aussi importants pour la régulation de la contraction de l'acto-myosine. Cette régulation passe par l'activation de la protéine PAK qui peut phosphoryler la cofiline. Ainsi, une fois phosphorylée, la cofiline est inactive et ne peut plus dépolymériser la F-actine, stabilisant le réseau d'actine et favorisant la contraction acto-myosine nécessaire pour la nucléokinèse (100). Les souris mutantes *Rac1^{-/-}/Rac3^{-/-}* présentent des INs avec un nombre très élevé de branches. Cependant, la longueur totale de leur neurite rostral est réduite (113). RhoA est une petite GTPase très importante pour la migration. Dans les INs, elle est inhibée par la protéine p27Kip1. La perte de fonction de cet inhibiteur mène à une perturbation de la migration, par la sur-activation de la myosine II (114). RhoA permet l'activation de la protéine ROCK. ROCK permet d'activer la myosine II par la phosphorylation de sa chaîne légère. De plus, cette kinase permet d'inactiver la *Myosin Light Chain Phosphatase* (MLCP). Finalement, la protéine ROCK active la *Myosin Light Chain Kinase* (MLCK). La MLCK va elle aussi phosphoryler la chaîne légère de la Myosine II. L'activité de MLCK est régulée par la calmoduline, une protéine activée lorsque le niveau de calcium intracellulaire est élevé (100).

Enfin, il y a une rétraction du neurite caudal. Les mécanismes impliqués dans cette rétraction dans les INs sont encore inconnus. Cependant, ces mécanismes doivent impliquer le remodelage du cytosquelette. Ainsi, la répétition de ces trois mouvements permet la mobilité du neurone vers les signaux chimioattractifs.

5- Altération du développement des INs dans l'épilepsie

Le développement de la technologie permettant la génération de souris transgéniques a permis de grandes avancées dans la découverte des mécanismes menant à l'épilepsie et a mis en évidence une nouvelle classe de pathologies : les interneuropathies. Plusieurs gènes importants pour le développement ou la fonction des INs ont ainsi été étudiés et leur implication dans l'épilepsie a été explorée

En effet, la dysfonction des INs mène, tant au niveau développemental qu'au niveau synaptique, à des épilepsies causées par un mauvais ratio entre l'inhibition et l'excitation. Cette section sera un survol rapide des défauts du développement (migration et maturation) des INs menant à l'épilepsie.

Le nombre d'INs dans le cortex est un facteur important pour un bon ratio d'inhibition et d'excitation. Au niveau du développement des INs, les souris mutantes *Dlx1*^{-/-}, un facteur de transcription important pour la différenciation et la survie des INs, présentent une perte de cellules SST, NPY et CR et ont une diminution de l'inhibition dans le cortex et dans l'hippocampe. Ceci induit une épilepsie et des défauts dans les oscillations gamma à l'âge adulte (P30) (115-117). De même, les souris porteuses de mutations causant une perte de fonction des facteurs de transcription requis pour le développement des INs de la MGE, soit *Nkx2.1*, *Lhx6* et *Sox6*, développent toutes une épilepsie précoce (32, 35, 37). De plus, les mutations du gène *CNTNAP2* causent le syndrome d'épilepsie focale avec dysplasie corticale chez l'humain. Ce gène est exprimé dans les éminences ganglionnaires et son expression est présente dans les INs en migration. La perte de fonction de *Cntnap2* chez les souris induit une diminution du nombre de cellules PV au niveau cortical qui n'a toutefois pas été observée chez les humains. Cependant, ces souris, tout comme les patients atteints du syndrome d'épilepsie focale avec dysplasie corticale ont des épilepsies et des troubles comportementaux (118).

Un autre indice montrant l'importance du bon développement des INs pour prévenir l'épilepsie est le phénotype des souris présentant un défaut dans l'expression du canal potassique KCC2 ou du co-transporteur NKCC1. Ces souris, tout comme les patients atteints d'épilepsie avec dysplasie focale corticale, présentent un mauvais ratio NKCC1/KCC2 induisant une excitation neuronale aberrante qui mène à des épilepsies et à des troubles du spectre de l'autisme (119).

Une mauvaise migration des INs a aussi été associée à des épilepsies. En effet, le facteur de transcription *Arx* est essentiel pour la migration des INs. Des mutations dans ce gène, le plus souvent causé par une expansion du triplet GCG, cause des spasmes infantiles liés au chromosome X chez l'humain (120-123). Ce facteur de transcription est sous la régulation de *Dlx1/2* et est exprimé dans les INs qui migrent de façon tangentielle. Il permet l'expression de gènes tels *Cxcr4*. Ainsi, les souris mutantes pour ce gène (souris *Arx*^{(CGC)10+7}) ont des spasmes

moteurs ressemblant à ceux retrouvés chez l'humain (120-123). Aussi, *ErbB4* est une autre protéine importante pour la bonne migration des INs et les souris *ErbB4* KO ont une migration anormale des INs menant à une perte de cellules PV et SST. La perte de *ErbB4* ou de sa voie signalétique sous-jacente passant par *p35/Cdk5* est associée à l'épilepsie chez la souris (124, 125).

Ainsi, plusieurs gènes régulant la migration ou la maturation des INs ont été associés aux épilepsies (126, 127). Un défaut dans un gène important pour la migration ou la maturation de ces cellules pourrait être la cause des encéphalopathies épileptogènes.

6- *Myo9b*

Le laboratoire du Dre Rossignol a identifié une nouvelle mutation *de novo* dans le gène *MYO9b* chez un patient atteint d'encéphalopathie épileptogène de type spasmes infantiles. Ce gène, codant pour la myosine non musculaire Myosine IXb, n'avait jamais été associé à une maladie humaine antérieurement. Cependant, certains éléments suggèrent que la mutation identifiée pourrait être pathogène. Tout d'abord, la mutation (G4678A) entraîne un changement d'acides aminés (V1560M) dans un domaine bien conservé de la protéine. De plus, cette mutation est prédite dommageable par les outils bioinformatiques incluant un score SIFT bas (score : 0) et un score PolyphenV2 élevé (score : 1) (3) (Figure 5). Enfin, l'expression précoce de *Myo9b* durant le développement cérébral (128) et les fonctions prédites de sa protéine comme agent promotogène nous portent à croire que ce gène est important pour la migration neuronale, tel que détaillé ci-dessous.

La Myosine IXb est une protéine encore peu connue. Elle fait partie de la famille des myosines, une grande famille de protéines qui peut être sous-divisée en 18 sous-classes. Les protéines faisant partie de cette famille sont des protéines motrices qui peuvent hydrolyser l'ATP et qui ont un domaine de liaison à l'actine (110). La myosine IXb est une myosine non conventionnelle (c'est-à-dire qu'elle n'est pas impliquée dans la contraction acto-myosine musculaire) connue pour son rôle dans la migration des cellules immunitaires (129). Elle est composée de plusieurs domaines. La tête de cette protéine contient 3 grands domaines, soit le domaine N-terminal associé à Ras, un domaine de liaison à l'ATP, ainsi qu'un domaine de

liaison à l'actine. Le cou de la protéine contient 4 domaines IQ, des domaines contenant des motifs de liaison à la calmoduline. Enfin, la queue de la protéine contient un domaine C1 riche en cystéine qui permet la régulation de plusieurs protéines kinases dont la protéine kinase C, un domaine activateur de GTPase (GAP), ainsi qu'une région riche en proline (130, 131) (Figure 5). La mutation retrouvée chez notre patient est localisée avant le domaine GAP. Ainsi, le changement d'acide aminé pourrait modifier la stabilité de la protéine et diminuer son expression ou changer la structure tridimensionnelle de celle-ci faisant en sorte que son domaine GAP ne soit plus accessible pour effectuer sa fonction.

De façon intéressante, la Myosine XIb a un domaine GAP qui hydrolyse le GTP des protéines Rho (132). Les protéines GAP sont importantes pour le contrôle de plusieurs voies de signalisation cellulaire. De ce fait, elles permettent l'hydrolyse du GTP en GDP, et ainsi l'inactivation rapide de plusieurs petites protéines G. Les petites protéines G peuvent hydrolyser elles-mêmes leur GTP. Cependant, cette réaction se fait très lentement. Ainsi, lorsque la cellule a besoin d'arrêter rapidement une voie de signalisation, elle a recours aux protéines GAP. Le domaine GAP de la Myosine IXb contient une charge positive qui interagit spécifiquement avec la charge négative de l'hélice A3 de RhoA de façon très spécifique (Figure 5). Ainsi, le même domaine GAP de Myo9b reconnaît spécifiquement RhoA, sans reconnaître Cdc42 ni Rac1 (133).

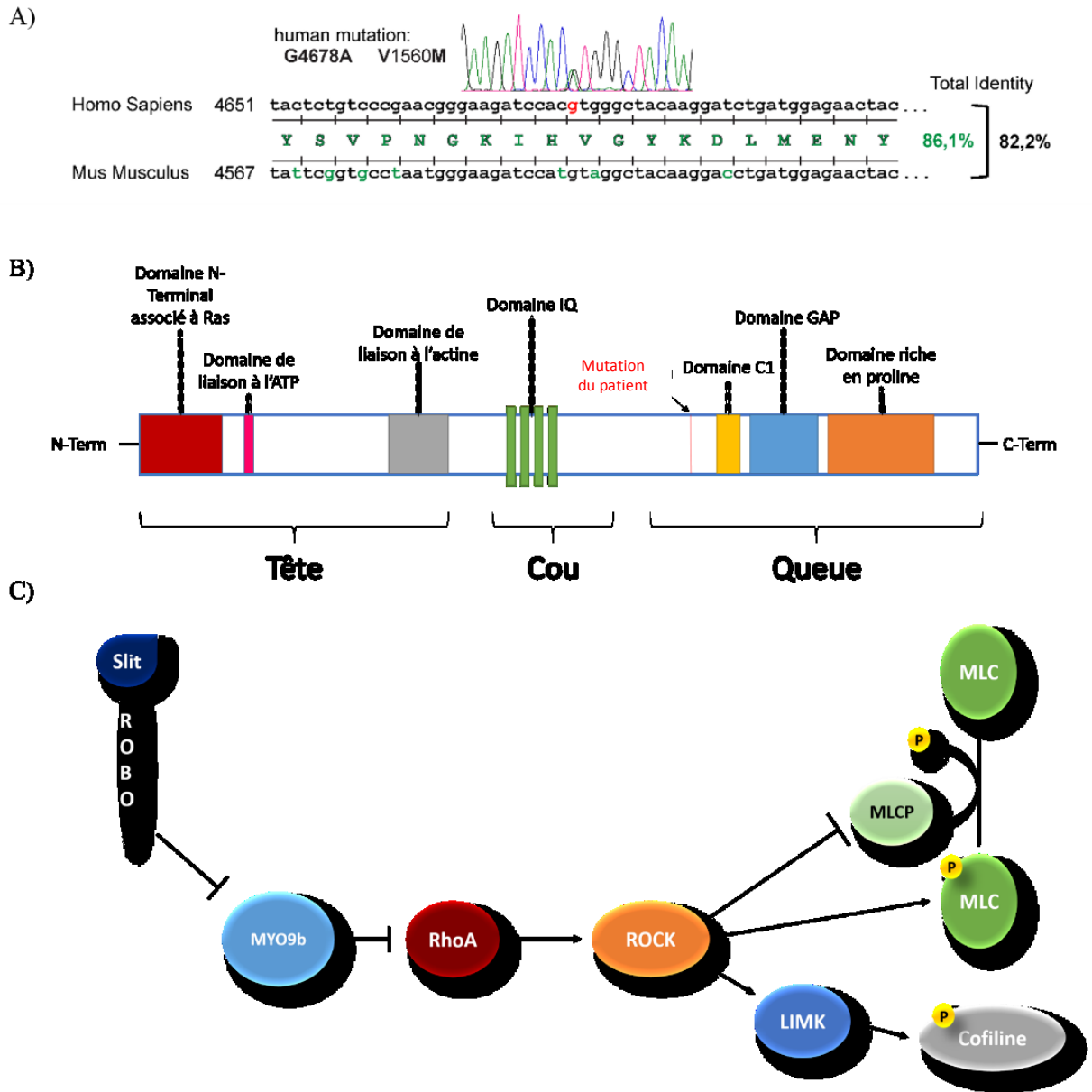


Figure 5 : Schématisation de la structure et de la fonction de MYO9b. A) Chromatogramme de la séquence de MYO9b du patient et celle d’Homo sapiens et de la souris. En vert, acide nucléique différent chez la souris et degré de conservation de la séquence entre ces 2 espèces. En noir, degré de conservation de la protéine entre ces 2 espèces. B) Schématisation des différents domaines de la protéine MYO9b. La structure de la protéine est divisée en 3 parties : la tête, le cou et la queue. C) Voie de signalisation connue de MYO9b. Inspiré de (130, 132, 133)

La Myosine IXb n'a été rapportée qu'une seule fois dans le cerveau, et ce dans des cellules pyramidales. Les auteurs de cet article montrent que *Myo9b* est fortement exprimée dans le cortex de rat à l'âge embryonnaire et que son expression diminue à l'âge adulte. De plus, une répression génique de *Myo9b* par électroporation *in utero* chez les rats mène à un nombre de dendrites moins élevé dans les cellules excitatrices de l'hippocampe ainsi qu'à une longueur totale réduite des dendrites de ces cellules. Ce phénotype est sauvé par la surexpression de la kinase ROCK (128).

L'expression et les rôles potentiels de *Myo9b* dans les INs ou dans la migration neuronale n'ont jamais été explorés jusqu'à présent. Cependant, le rôle de *Myo9b* a été décrit au niveau de la migration des cellules immunitaires et des cellules cancéreuses.

En effet, la Myosine IXb est hautement exprimée dans les cellules immunitaires. Les macrophages *Myo9b*^{-/-} sont incapables de suivre un gradient chimiotactile (129). Ces cellules présentent une morphologie ronde et sont incapables de produire des lamellipodes. De plus, ces cellules ont une perte de polarisation, c'est-à-dire qu'elles forment des filopodes tout autour de la cellule. Ainsi, les macrophages ont une motilité réduite (129). Au niveau des cellules dendritiques, il y a une colocalisation entre *Myo9b* et la F-actine. MYO9b interagit à l'extrémité positive (+ end) de la F-actine et catalyse l'hydrolyse de RhoA-GTP (Figure 5). Les cellules dendritiques *Myo9b*^{-/-} présentent une augmentation de l'activité RhoA qui mène à une stabilisation de la F-actine et une diminution de la motilité de ces cellules. En effet, ces cellules sont moins capables de suivre un gradient chimioattractif, en partie dû à l'altération de l'organisation de leur cytosquelette d'actine (134).

Dans les cellules cancéreuses, l'augmentation de l'expression de MYO9b mène à une augmentation de la migration. Dans les cellules cancéreuses de la prostate, MYO9b est présente dans le soma cellulaire. Les cellules *Myo9b*^{kd} migrent beaucoup moins vite. Ceci serait causé par l'augmentation de la phosphorylation de la MLC (Figure 5) (135). Au niveau des cellules cancéreuses de poumons, le domaine GAP de la Myosine IXb interagit avec le récepteur Robo (Figure 5). La liaison de la chimiokine répulsive *Slit* au récepteur Robo inactive la Myosine IXb, ce qui entraîne une augmentation de la protéine RhoA en conformation active. Ainsi, il y a une diminution de la migration des cellules cancéreuses du poumon (133). Le complexe Myosine

Ixb1/Robo/RhoA agirait donc comme suppresseur de métastase tumorale lors de la liaison de *Slit* (133). Puisque *Slit*, *Robo* et *RhoA* sont des molécules connues importantes pour la régulation de la migration des INs, il est possible que la Myosine IXb interagisse aussi avec ces protéines dans les INs et qu'elle soit importante pour réguler la migration des INs.

Question de recherche

Les encéphalopathies épileptogènes (EE) sont des maladies graves de l'enfance dont la cause est souvent inconnue. L'avancée des techniques d'investigation génétique permet maintenant d'identifier plusieurs mutations *de novo* chez des patients avec des EE inexplicables sporadiques. Certaines de ces mutations pourraient être la cause de ces épilepsies. Dans le but d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans les EE, le laboratoire de la Dre E. Rossignol a effectué un séquençage d'exome chez des patients atteints de spasmes infantiles. Elle a identifié plusieurs nouveaux gènes candidats d'épilepsie. Ces gènes touchent une grande variété de composantes du développement et de la fonction des neurones. Puisque des perturbations du réseau inhibiteur, dites « interneuronopathies », peuvent mener à des épilepsies, tant chez la souris que chez l'humain, il est possible que certains des nouveaux gènes candidats identifiés causent l'épilepsie en affectant le développement des INs.

Ainsi, sachant qu'un variant dans *Myo9b* n'ayant jamais été rapporté a été identifié par séquençage d'exome chez un patient souffrant d'EE sans malformation cérébrale majeure et sachant que la myosine IXb est exprimée dans le cerveau et qu'elle est impliquée dans la migration de plusieurs types de cellules dont les cellules immunitaires, nous postulons qu'elle puisse jouer un rôle dans la migration des INs corticaux, ce qui altérerait l'équilibre entre l'excitation et l'inhibition corticale et causerait une épilepsie.

Hypothèse et objectifs

Je postule que la Myosine IXb, codée par le gène *Myo9b*, joue un rôle fondamental dans la migration tangentielle des interneurons GABAergiques corticaux et qu'une perturbation de son expression cause un défaut de migration de ces cellules.

Pour valider cette hypothèse, je vais documenter la localisation embryonnaire et adulte de *Myo9b* dans les interneurons GABAergiques corticaux. Puis, j'investiguerai les conséquences de la répression sélective de *Myo9b* dans les INs par électroporation *ex vivo* d'un shRNA spécifique dans des cultures organotypiques de cerveaux murins embryonnaires.

Méthodologie

Animaux

Toutes les expérimentations animales ont été faites en accord avec le protocole éthique approuvé par le comité d'éthique animale (CIBPAR) du CHU Ste-Justine.

Afin de pouvoir visualiser les interneurons GABAergiques (INs) durant leur développement embryonnaire *ex vivo*, j'ai généré une lignée de souris $Dlx5/6^{cre};RCE^{EGFP}$ chez lesquelles les INs sont marqués génétiquement par la protéine fluorescente verte (GFP). Pour ce faire, j'ai croisé des souris $Dlx5/6^{cre}$ avec des souris reportrices Cre-dépendantes $RCE^{EGFP/EGFP}$, pour obtenir une lignée de souris $Dlx5/6^{cre};RCE^{EGFP}$. Les couples reproducteurs sont génotypés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Un bout de queue est lysé dans un tampon de lyse (Tris, HCl 100 mM, EDTA 5mM, SDS 0,2% et NaCl 200 mM) avec de la protéine kinase K (0,6 mg/mL) durant 12 heures à 55 °C. L'ADN est extrait de la façon suivante. Les tubes sont centrifugés à 13 000 révolution par minute (RPM) durant 10 minutes, le surnageant est transféré, puis 500 µL d'isopropanol est ajouté au surnageant afin de précipiter l'ADN. Les tubes sont agités durant 15 minutes et l'ADN est récupéré à l'aide d'un embout de pipette, trempé dans de l'éthanol 70 % et déposé dans 100µL de tampon tris-EDTA (TE). Les tubes sont mis dans un bain à 55 °C durant 30 minutes, puis sont entreposés à 4°C. L'ADN est utilisé pour faire la PCR, tel que détaillé dans la section suivante.

Par ailleurs, les embryons $Dlx5/6^{cre};RCE^{EGFP}$ utilisés pour nos expériences prénatales étaient identifiés par fluorescence trans-crânienne à 13.5 jours embryonnaires (e13,5) à l'aide d'une lampe UV nous permettant de visualiser la MGE. J'ai choisi cet âge puisqu'il s'agit du début de la migration des INs provenant de la MGE, les INs ayant été le plus souvent associés à l'épilepsie. L'âge embryonnaire était calculé à partir du jour de détection du bouchon vaginal chez les mères, correspondant à e0,5. Pour les expériences d'immunohistochimie visant à d'investiguer la présence de Myo9b dans les INs en migration, des souris $Dlx5/6^{cre};RCE^{EGFP}$ étaient identifiées par fluorescence à e16,5.

Les souris $G42^{EGFP}$, chez lesquelles les INs PV sont sélectivement marqués en fluorescence par la GFP, ont été utilisées pour vérifier la présence de *Myo9b* dans les interneurons à l'âge adulte. Ces souris $G42^{EGFP}$ sont génotypées par PCR, tel que décrit ci-bas

Génotypage

Le génotypage était performé par PCR. Le programme de la PCR était fait avec 2 uL d'ADN extrait des bouts de queues dans le tampon à PCR (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl; Invitrogen). Les conditions de la PCR varient selon l'allèle génotypé. Le produit de PCR est gardé à 4 °C et est migré sur un gel à 2 % d'agarose, afin de déterminer le poids moléculaire des bandes amplifiées.

Allèle RCE^{EGFP} : Les amorces utilisées pour génotyper l'allèle RCE sont CCCAAAGTCGCTCTGAGTTGTTATC, GAAGGAGCGGGAGAAATGGATATG et CCAGGCGGGCCATTTACCGTAA. Les réactifs suivants sont ajoutés à la réaction de PCR : 1,5 mM de chlorure de magnésium, 2,0 mM de dNTP (Invitrogen, 10297-018) et 0,1 U/μL de Taq polymérase (Invitrogen, 10342-020). Le programme de la PCR a une dénaturation à 94 °C durant 1 min, puis 35 cycles comprenant une dénaturation à 94 °C de 45 s, une hybridation à 59,0 °C de 45 s et une élongation à 72 °C de 1 min. La PCR finit avec une élongation finale de 5 min à 72 °C. Sur le gel, une bande sauvage est retrouvée à 550 pb et une bande mutante à 350 pb.

Allèle Cre : Les amorces utilisées pour génotyper l'allèle Cre sont TAAAGATATCTCACGTAAGTACGCGGTG et TCTCTGACCAGAGTCATCCTTAGC. On ajoute à la réaction de PCR 1,5 mM de chlorure de magnésium, 2,0 mM de dNTP (Invitrogen, 10297-018) et 0,1 U/μL de Taq polymérase (Invitrogen, 10342-020). Le programme de la PCR a une dénaturation à 95 °C durant 3 min, puis 30 cycles comprenant une dénaturation à 95 °C de 20 s, une hybridation à 56,0 °C de 30 s et une élongation à 72 °C de 30 s. La PCR finit avec une élongation finale de 10 min à 72 °C. Une bande mutante est retrouvée à 300 pb.

Allèle $G42^{EGFP}$: Les amorces utilisées pour génotyper l'allèle $G42^{EGFP}$ sont GACTCCGGGTTCCCTCACACTACC et GAGATCAGCAGCCTCTGTTCC. 2,0 mM de

chlorure de magnésium, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen, 10297-018) et 0,03 U/μL de Taq polymérase (Invitrogen, 10342-020) sont ajoutés à la réaction. Le programme de la PCR a une dénaturation à 94 °C durant 3 min, puis 35 cycles contenant une dénaturation à 94 °C de 30 s, une hybridation à 60,0 °C de 1 min 30 s et une élongation à 72 °C de 30 s. La PCR finit avec une élongation finale de 2 min à 72 °C. Une bande à 450 pb est retrouvée si la souris porte le transgène G42^{EGFP}.

Allèle *Dlx5/6^{cre}* : Les amorces utilisées pour génotyper l'allèle *Dlx5/6^{cre}* sont CAGAATTGATCCTGGGGAGCTACG et GGACAGAAGCATTTTCCAGG. Deux micromolaires de chlorure de magnésium, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen, 10297-018) et 0,03 U/μL de Taq polymérase (Invitrogen, 10342-020) sont ajoutés à la réaction. Le programme de la PCR a une dénaturation à 95 °C durant 3 min, puis 35 cycles contenant une dénaturation à 95 °C de 20 s, une hybridation à 56,0 °C de 30 s et une élongation à 72 °C de 30 s. La PCR se termine avec une élongation finale de 10 min à 72 °C. Une bande à 343 pb est retrouvée si la souris porte le transgène *Dlx5/6^{cre}*.

Construction des plasmides

Dlx5/6-shRNA-IRES2-tdTOMATO : Afin de modifier génétiquement les INs en migration de façon sélective, j'ai construit des plasmides exprimant un shRNA spécifique anti-Myo9b ou un shARN témoin brouillé (scramble) ainsi qu'une cassette de fluorescence pour visualisation ultérieure (tdTomato), le tout sous le contrôle d'un promoteur sélectif aux INs (*Dlx5/6*). Les plasmides ont été générés de la façon suivante.

Les plasmides contenant les ARN interférents ont été clonés à partir d'un plasmide *Lhx6-shRNA6-IRES2-EGFP* disponible au laboratoire et contenant un shARN témoin brouillé (scramble) (Figure 6). Le fragment tdTOMATO a été amplifié à partir du plasmide *pCAG-IRES2-tdTOMATO* (don du laboratoire DiCristo construit par un collaborateur). L'amplification s'est faite avec les amorces 5'-AAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAAC-3' et 5'-TTATGATCTAGAGTCGCTTACTTGTSCAGCTCGTC-3' à l'aide d'une polymérase haute-fidélité Q5 (Invitrogen). Le programme de la PCR a une dénaturation à 95 °C durant 5 minutes,

puis 35 cycles comprenant une dénaturation de 30 s à 95 °C, une hybridation de 30 s à 61,1 °C et une élongation de 1 min 30 s à 72 °C. La PCR finit avec une élongation finale de 5 min à 72 °C, puis est gardée à 4 °C. Le fragment obtenu a été purifié sur gel avec un kit PROMEGA (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, A9281).

Une approche de Gibson Assembly (NEB) a été utilisée afin d'insérer le fragment de PCR tdTOMATO dans le plasmide digéré *Lhx6-shRNA6-IRES*. Spécifiquement, le plasmide *Lhx6-shRNA6-IRES2-EGFP* a été digéré par *HindIII* (Fermentas) et *NotI* (Fermentas) afin de retirer le EGFP. Le produit de digestion et le produit de PCR ont été incubés pendant 30 min à 50 °C avec la solution tampon contenant une exonucléase, une polymérase et une ADN ligase. Le produit est ensuite transformé dans des bactéries NEB 5- α . Deux microlitres de solution de ligation sont ajoutés aux bactéries. Le mélange d'ADN et de bactéries est laissé sur glace pendant 30 minutes. Un choc de chaleur à 42°C pendant 30 s est fait, puis les bactéries sont étendues sur des pétris contenant un milieu de culture (tryptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 10 g/L et agar 15 g/L) et de la kanamycine (10 μ g/mL) et sont mises en culture à 37 °C durant toute la nuit. Le plasmide obtenu est *Lhx6-shARN6-IRES2-tdTOMATO*. La validation des plasmides s'est fait par leur digestion avec *XhoI* et *ASEI*. Les bandes attendues étaient de 886 pb si le plasmide avait incorporé le tdTOMATO. Le gène rapporteur tdTOMATO amplifié par PCR, a été séquencé afin de confirmer qu'il n'y avait pas d'erreur de transcription au sein de la séquence.

Le shARN témoin brouillé (scramble) (Open Biosystem) avait déjà été utilisé par l'équipe de la Dre Rossignol et était présent dans le plasmide *Lhx6-shARN6-IRES2-EGFP* initialement utilisé. Le shARN ciblant *Myo9b* a été conçu à partir d'une séquence publiée précédemment et démontrée spécifique et efficace pour la répression de *Myo9b* dans les neurones pyramidaux (128). Le shARN ciblant *Myo9b* a été généré à partir de longs oligonucléotides hybridés contenant des sites de digestion *XhoI* et *EcoRI* de part et d'autre de la séquence (CCACCTACCACCTGCACATCTA). L'hybridation des longs oligonucléotides s'est faite dans un tampon 100 mM d'acétate de potassium, 30 mM HEPES à pH 7,5 à 94 °C durant 3 min. Les shARN obtenus et le plasmide *Lhx6-shARN6-IRES2-tdTOMATO* ont été digérés avec *XhoI* et *EcoRI* afin d'échanger le shARN témoin pour celui ciblant *Myo9b*. Une ligation entre

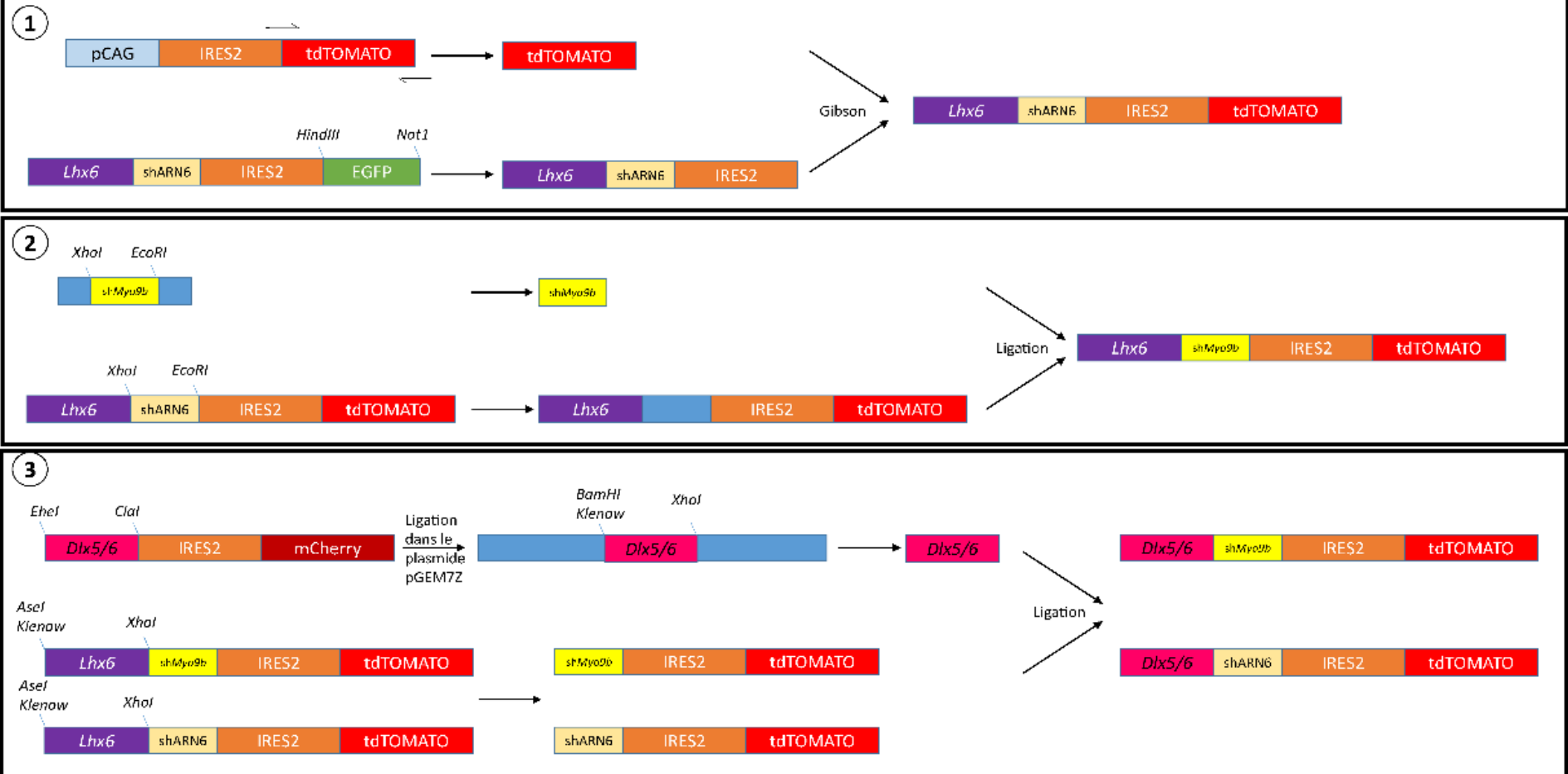
les produits de digestion a été faite, puis le produit de ligation a été transformé dans des bactéries 5ht3 α me permettant d'obtenir le plasmide *Lhx6-shMYO9b-IRES2-tdTOMATO*. Une validation du plasmide a été faite par digestion HindIII et XhoI. Une bande de 500 pb est obtenue lorsque le clonage a fonctionné.

Nos premières expériences utilisant le plasmide *Lhx6-shMYO9b-IRES2-tdTOMATO* pour une expression embryonnaire par électroporation dans des cerveaux embryonnaires de souris (tel que détaillé plus bas) ont échoué à révéler un signal fluorescent. Il était donc impossible de visualiser les INs ciblés par le promoteur spécifique aux INs de la MGE *Lhx6*. Malgré différentes étapes d'optimisation (variation de la concentration de plasmide, du temps d'exposition, des paramètres d'électroporation, etc), nous n'avons pu utiliser ce plasmide pour nos fins expérimentales. Dans ce contexte, nous avons décidé de remplacer le promoteur *Lhx6* par un autre promoteur spécifique aux INs et exprimé plus fortement que *Lhx6*.

Pour cette raison, nous avons décidé d'utiliser le promoteur *Dlx5/6*, puisque son expression forte et soutenue durant la migration des INs nous permettait d'obtenir un signal plus fort et plus facilement observable par microscopie que lors de l'utilisation du promoteur *Lhx6*. Le promoteur *Dlx5/6* provient du plasmide *Dlx5/6-IRES2-mCherry* présent dans le laboratoire de la Dre Rossignol (don de G. Fishell, NYU, USA). Le promoteur *Dlx5/6* a été excisé du plasmide par une digestion avec EheI et ClaI. Du klenow a été ajouté afin de former des extrémités franches. Le promoteur a été sous-cloné dans le plasmide *pGEM7Z*. Le plasmide *pGEM7Z-Dlx5/6* a été digéré avec BamHI, suivi d'une digestion au klenow. Les plasmides *Lhx6-shARN6-IRES2-tdTOMATO* et *Lhx6-shMYO9b-IRES2-tdTOMATO* ont été digéré avec AseI, suivi d'une digestion au Klenow. Ainsi les extrémités digérées des plasmides *pGEM7z-Dlx5/6*, *Lhx6-shARN6-IRES-tdTOMATO* et *Lhx6-shMyo9b-IRES-tdTOMATO* ont des extrémités franches. Les plasmides *Lhx6-shARN6-IRES2-tdTOMATO* et *Lhx6-shMyo9b-IRES2-tdTOMATO* ainsi que le plasmide *pGEM7Z-Dlx5/6* ont été digéré avec *XhoI*. Ainsi, le promoteur *Lhx6* a été enlevé du plasmide contenant les shARN afin d'y insérer le promoteur *Dlx5/6*. Le promoteur *Dlx5/6* a été déphosphorylé avec la FastAP durant 10 min à 37°C, puis cette enzyme a été désactivée à 75 °C durant 15 min. Une ligation entre le promoteur *Dlx5/6* et les plasmides contenant les shARN a été faite durant 12 heures à 16 °C. Le produit de ligation a été transformé dans des bactéries 5ht3 α tel que décrit précédemment. L'ADN de quelques colonies a été

amplifié par MiniPrep (kit Promega). Les colonies de bactéries ayant incorporé le promoteur *Dlx5/6* ont pu être sélectionnées par digestion de leur ADN par HindIII. Les plasmides *Dlx5/6-shARN-IRES2-tdTOMATO* avaient un motif de digestion contenant 3 bandes : 5130 pb, 730 pb et 550 pb.

A)



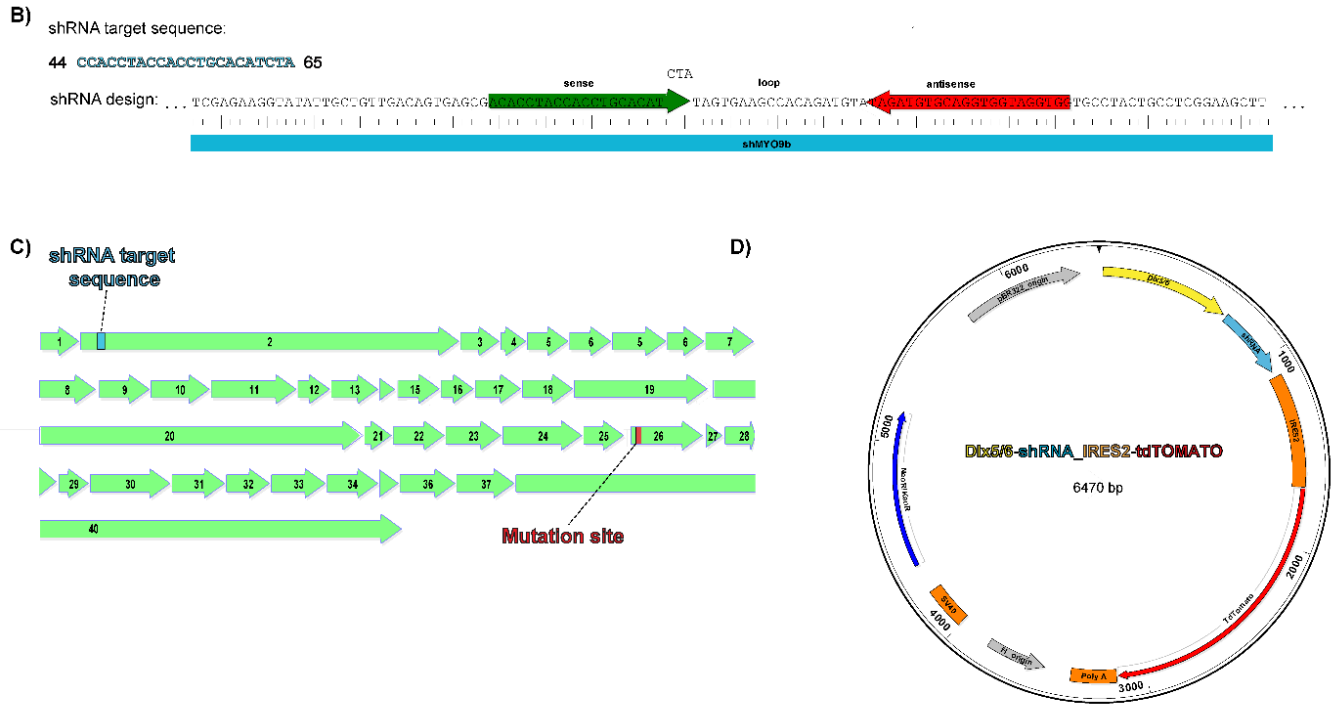


Figure 6 : Plasmides *Dlx5/6-shARN6-IRES2-tdTOMATO* et *Dlx5/6-shMyo9b-IRES2-tdTOMATO*. A) Le clonage des deux plasmides a été réalisé en parallèle. Ce clonage est divisé en trois étapes, soit 1- le clonage du plasmide *Lhx6-shARN6-IRES2-tdTOMATO*, 2- le clonage du plasmide *Lhx6-shMyo9b-IRES2-tdTOMATO* et 3- le clonage du promoteur *Dlx5/6* dans les 2 plasmides afin d'obtenir les plasmides finaux *Dlx5/6-shARN6-IRES2-tdTOMATO* et *Dlx5/6-shMyo9b-IRES2-tdTOMATO*. B) Séquence du shARN ciblant *Myo9b*. C) Localisation de la séquence ciblée par le shARN et de la mutation du patient dans le gène *Myo9b*. Chaque flèche correspond à un exon. D) Schématisation du plasmide final *Dlx5/6-shMyo9b-IRES2-tdTOMATO*.

Dlx5/6-mmMyo9b-IRES2-tdTOMATO et *Dlx5/6-mmMyo9b^{ΔV1560M}-IRES2-tdTOMATO* : Afin de faire un sauvetage du phénotype observé et afin de vérifier l'impact de la mutation du patient sur le phénotype, j'ai construit un plasmide exprimant l'ADN codant de *Myo9b* résistant au shARN et un plasmide exprimant l'ADN codant de *Myo9b*, modifié avec la mutation du patient et résistant au shARN, le tout sous le contrôle d'un promoteur sélectif aux INs (*Dlx5/6*). Les plasmides ont été générés de la façon suivante.

Afin d'amplifier la séquence murine de *Myo9b*, une librairie d'ADN codante a été créée à partir de cerveaux d'embryon de souris de type sauvage à e13,5. La mère a été sacrifiée par dislocation cervicale et les trompes utérines ont été prélevées et gardées dans du PBS 1X à 4 °C. Les embryons ont été sortis du sac amniotique, puis décapités et les cerveaux ont été excisés dans du PBS 1X. L'ARN a été extrait des cerveaux de la façon suivante. Les cerveaux sont d'abord homogénéisés par un va-et-vient à l'aide d'une pipette dans du TRIzol® (ThermoFisher) (3 :1) à température pièce. Une fois homogénéisé, l'échantillon a été laissé à température pièce durant 5 min. Deux cents microlitres de chloroforme ont été ajoutés et le tout a été agité durant 15 s, puis incubé à température pièce durant 15 min et centrifugé à 12 000 x g à 4 °C durant 15 min. La phase aqueuse a été retirée et l'ARN a été isolé à partir de cette phase. De l'isopropanol a été ajouté à la phase aqueuse dans un ratio 2 :3 et incubé à température pièce pour 10 min. Le tout a été centrifugé à 12 000 x g à 4 °C pour une durée de 10 min. L'ARN a été précipité au fond du tube et le surnageant a été retiré. L'ARN fut lavé avec de l'éthanol 75 %. L'ARN a été séché et resuspendu dans de l'eau sans ARNase pour avoir une concentration finale de 2,0 µg/µL.

L'ADN codant a été obtenu par une réaction de transcription inverse SuperScript® IV (Invitrogen). La réaction s'est faite avec 10 µg d'ARN, 1,25 µM d'oligo d(T), 1,25 µM d'hexamère, du tampon SSIV 1X, un inhibiteur d'ARNase 4 U/µL, 1 mM de dNTP et la transcriptase inverse SuperScript® IV 10 U/µL (Invitrogen). La réaction s'est faite incubée à 23 °C pendant 10 min, puis à 55 °C pour 10 min et à 80 °C durant 10 autres min. L'ADNc est conservé à -20 °C.

Le plasmide *Dlx5/6-IRES2-EGFP* a été formé à partir du plasmide *Lhx6-shARN6-IRES2-EGFP*. Le promoteur *Lhx6* a été excisé avec le shARN et remplacé par le promoteur *Dlx5/6*. Cette étape a été faite par une autre étudiante à la maîtrise. Le *Dlx5/6* a été excisé du plasmide par une digestion BamHI, suivie d'un traitement au klenow, puis d'une digestion XhoI. Le promoteur pCAG du plasmide *pCAG-IRES2-EGFP* (Clontech) a été digéré par AseI, suivi d'un traitement au klenow, puis a été digéré par XhoI. Une ligation a été effectuée entre le plasmide ouvert et le promoteur *Dlx5/6*. Puisque la séquence codante de *Myo9b* est très longue, elle a été amplifiée en 3 sections, puis clonée dans le plasmide *Dlx5/6-IRES2-EGFP*. La partie C-terminale de *Myo9b* a été amplifiée à l'aide des amorces

GAATGACCTTCGATCGCAGAAGACACCCATCGAAAGCTTG, la partie médiane a été amplifiée avec les amorces ACCAAGAGGAGCTAGCACGCCTTCAGAAAACTG et GTGTCTTCTGCGATCGAAGGTCATTACCTTGTTG et la partie N-terminale de *Myo9b* a été amplifiée à l'aide des amorces AGCGCGGCGGGGTACCGAAGGAGCCAGACCTCATGC et CTGAAGGGGTGCTAGCTCCTCTTGGTAGGTCTTCCATG avec la polymérase haute-fidélité Q5. L'amplification de la partie N-terminale s'est fait par PCR avec le programme suivant. La PCR commence avec une étape de dénaturation durant 5 min à 94 °C, puis 35 cycles contenant une étape de dénaturation de 30 sec à 94 °C, une hybridation de 30 s à 67,0 °C et une élongation d'une minute à 72 °C. La PCR se termine avec une élongation finale de 5 min à 72 °C, puis est gardée à 4 °C. Le programme pour l'amplification de la partie médiane de *Myo9b* se fait selon les conditions suivantes : une étape de dénaturation de 5 min à 94 °C, 35 cycles contenant une étape de dénaturation de 30 s à 94 °C, une hybridation de 30 s à 59,7 °C et une élongation de 1 min à 72 °C et une élongation finale de 5 min à 72 °C. Finalement, l'amplification de la partie C-terminale se fait de façon suivante : une étape de dénaturation de 30 s à 98 °C, 35 cycles contenant une étape de dénaturation de 10 s à 98 °C, une hybridation de 30 s à 61,0 °C et une élongation de 1 min 30 sec à 72 °C et une élongation finale de 5 min à 72 °C. Une approche de Gibson Assembly (NEB), tel que décrit plus haut, a été utilisée afin d'insérer les 3 fragments dans le plasmide ouvert par digestion avec XhoI et NheI. La méthode a été décrite ci-haut. La validation des plasmides se fait par 3 digestions, soit une digestion avec HindIII, une digestion avec XhoI et NheI et une digestion avec Drd1. La digestion avec HindIII devrait produire un patron de bandes contenant une bande à 370 pb, une à 550 pb, une à 600 pb, une à 1556 pb, une à 8608 pb et une à 4432 pb. La deuxième digestion devrait donner 2 bandes : 2121 pb et 9560 pb. La digestion Drd1 devrait donner une bande à 100 pb, une à 1800 pb et une à 3000 pb. Les colonies positives ont été séquencées afin de confirmer qu'il n'y avait pas d'erreur de transcription.

La mutation du patient a été introduite par mutagenèse dirigée sur le fragment médian avant la réaction de Gibson assembly. Ainsi, la séquence de la partie médiane de *Myo9b* a 2 fragments contenant la mutation retrouvée chez le patient. Pour avoir le changement d'acide aminé V1560M, 2 acides nucléiques ont dû être modifiés (Figure 5). Ces modifications ont été

introduites aux amorces afin d'être insérées dans la séquence. Ainsi, 2 fragments de la partie médiane ont été amplifiés avec les amorces suivantes : pour la première réaction, CCCGGCCAGGAAGACTCTAGAGGTAC et GTCCTTGTAGCCCATATGGATCTTCCC et pour la 2^e réaction, GGGAAGATCCATATGGGCTACAAGGACCTG et CTTTTGATCCGGACCCCCTCATAGG. Les 2 fragments ont été purifiés sur gel, puis une réaction de PCR avec la première amorce de la première réaction de PCR et de la deuxième amorce de la deuxième réaction de PCR a été effectué afin d'obtenir le fragment médian contenant la mutation du patient. Le plasmide *Dlx5/6-mmMyo9b^{ΔV1560M}-IRES2-tdTOMATO* a été obtenu par réaction de Gibson assembly tel que décrit ci-dessus.

Électroporation *ex vivo* et tranches organotypiques

Les électroporations *ex vivo* dans les MGE a été effectuées dans le cerveau d'embryons de souris à E13.5 (Figure 7). La mère a été sacrifiée par dislocation cervicale et les trompes utérines ont été prélevées et gardées dans du PBS 1X à 4 °C. Le génotype des embryons a été vérifié par lampe UV lorsque nécessaire. Les embryons présentant le bon génotype, soit *Dlx5/6^{cre};RCE^{-/-}* pour l'électroporation des shARN seuls ou sauvage (exprimant la EGFP) pour la co-électroporation du shARN et du plasmide sauvetage, ont été sortis du sac amniotique, puis décapités et les têtes mises dans un tampon d'électroporation (0,7 mM Na₂PO₄, 20 mM Hepes, 137 mM NaCl, 5 mM KCl et 6 mM D-Glucose). Environ 3 ug d'ADN des plasmides (*Dlx5/6-shMyo9b-IRES2-tdTOMATO*, *Dlx5/6-sh6-IRES2-tdTOMATO*, *Dlx5/6-mmMyo9b-IRES2-EGFP* et *Dlx5/6-shMyo9b-IRES2-tdTOMATO* ou *Dlx5/6-mmMyo9bΔ-IRES2-EGF* et *Dlx5/6-shMyo9b-IRES2-tdTOMATO*) dans 0,05% Fastgreen ont été injectés dans un des ventricules du cerveau. L'ADN a été électroporé dans la MGE avec 4 impulsions électriques de 50 V d'une durée de 50 ms chacune, espacées de 250 ms. Le cerveau a ensuite été extrait de la boîte crânienne et enveloppé d'agarose 4 % à basse température de fusion. Le bloc formé a été tranché pour obtenir des tranches coronales de 250 μm d'épaisseur à l'aide d'un vibratome (Leica VT1000S) à fréquence de 8 Hz à une vitesse de 350 μm/s dans un tampon ACSF 1X (87 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₂ 75 mM sucrose et 20 mM glucose). Les tranches contenant le MGE électroporé ont été récupérées et placées sur des membranes de

polycarbonate semi-perméable (Whatman Nucleopore Track-Etch Membrane). Les tranches ont ensuite été mises en culture 72 heures à 37 °C dans un milieu neurobasal (Invitrogen, 1,8 % B27, 2 mM glutamine, 5 % sérum de cheval et N2 1X).

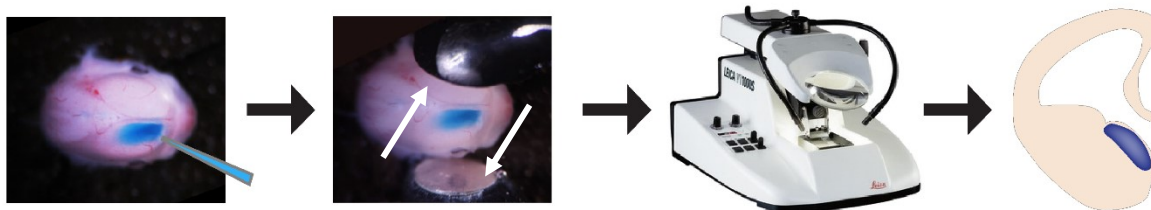


Figure 7 : Schématisation de l'électroporation *ex vivo*. L'ADN est d'abord injecté dans un des ventricules du cerveau de souris. Les électrodes (flèches) sont placées autour de la tête de sorte que la MGE soit électroporée. Le cerveau est excisé de la boîte crânienne, puis tranché au vibratome. Les tranches contenant un MGE électroporé sont mises en cultures pendant 72h à 37 °C.

Immunohistochimie

Tranches organotypiques :

Afin de visualiser les INs modifiés génétiquement, une immunohistochimie visant à révéler la EGFP (marquant les INs dans les cerveaux *Dlx5/6^{cre};RCE^{-/-}*) et le tdTomato (libellant les INs modifiés par électroporation) a été réalisée. Plus précisément, les tranches organotypiques ont été fixées avec de la paraformaldéhyde (PFA) 4 % dans du PBS 1X à 4 °C toute la nuit. Après la fixation, les tranches ont été lavées 3 fois avec du PBS 1X durant 15 min. Une solution de sucrose 30 % dans du PBS a été ajoutée aux tranches pour la cryopréservation. Le tout a été agité 10 min, puis a été placé à -20 °C. Une fois congelées, les tranches sont restées à -20 °C durant 15 min, puis elles ont été décongelées à 21 °C. Les tranches ont été lavées trois fois avec du PBS 1X. Les tranches ont été incubées pendant 2h dans une solution de blocage 0,1 % Triton, 10 % sérum de chèvre dans du PBS 1X. Cette incubation fut suivie par une incubation toute la nuit à 4 °C dans une solution d'anticorps primaire : souris anti-NeuN (1 :1000; Milipore), rat anti-GFP (1 :1000; Rockland) et lapin anti-dsRED (1 :1000; Clontech) dans une

solution de PBS 1X, 0,1 % Triton, 5 % sérum de chèvre. Les tranches ont été lavées trois fois dans du PBS 1X durant 10 min. Les anticorps secondaires de chèvre suivant ont été ajoutés : anti-rat Alexa-488 (1 :1000; invitrogen), anti-souris Alexa 647 (1 :1000; invitrogen) et anti-lapin Alexa-594 (1 :1000; invitrogen) dans une solution PBS 1X, 0,1 % Triton, 0,5 % sérum de chèvre. Le tout est laissé 2 h à 21 °C. Les tranches ont été lavées 3 fois avec du PBS 1X durant 15 min. Les sections ont été montées sur des lames de verres pour visualisation en microscopie confocale avec du floromount-G (SouthernBiotech).

Cryosections :

Afin d'investiguer l'expression naturelle de *Myo9b* dans des cerveaux d'embryons de souris de type sauvage, des immunohistochimies ont été effectuées sur des tranches de cerveaux embryonnaires. Spécifiquement, les souris gestantes ont été sacrifiées à E16,5 par dislocation cervicale. Les trompes utérines ont été prélevées et gardées dans du PBS 1X à 4 °C. Le génotype des embryons de souris a été vérifié par fluorescence sous lumière UV. Les cerveaux des embryons *Dlx5/6^{cre};RCE^{EGFP}* ont été excisés et fixés avec de la PFA 4 % dans du PBS 1X à 4 °C toute la nuit. Les cerveaux ont ensuite été transférés dans du sucrose 30 % dans du PBS 1X à 4 °C toute la nuit, puis plongés dans du Cryomatrix pour cryopréservation. Les tranches coronales de 18 µm ont été obtenues au vibratome afin d'échantillonner tout le cerveau.

Les souris *G42^{EGFP}* âgées de 60 jours ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale de sodium-pentobarbital (100 mg/kg). Elles ont ensuite été perfusées avec une injection transcardiaque de PFA 4 % dans du PBS. Le cerveau a été prélevé par microdissection et a été fixé 1h dans de la PFA 4 % à 4 °C. Il a ensuite été transféré dans du sucrose 30% dans du PBS pour toute la nuit à 4 °C et a été inclus le lendemain dans du Cryomatrix. Des coupes coronales de 18 µm du cortex somatosensitif ont été obtenues au cryostat.

Les sections (embryonnaires ou adultes) ont été immergées durant 2 h dans une solution de blocage de 0,3 % Triton, 10 % sérum de chèvre dans du PBS 1X. Cette incubation a été suivie par une incubation de 48 h à 4 °C dans une solution d'anticorps primaire contenant les anticorps adéquat : poulet anti-NeuN (1 :1000;), rat anti-GFP (1 :1000; Rockland), souris anti-Myo9b (1 :500;), lapin anti-somatostatine (1 :500; Santa Cruz) dans 0,3 % Triton, 5 % sérum de chèvre dans du PBS 1X. Les tranches ont été lavées 3 fois dans du PBS 1X durant 10 min. Ensuite, les

anticorps secondaires adéquats ont été ajoutés : anti-rat Alexa-488 (1 :1000; invitrogen), anti-souris Alexa 647 (1 :1000; invitrogen) et anti-lapin Alexa-594 (1 :1000; invitrogen), anti-poulet Alexa-555 (1 :1000; Milipore). Le tout a été laissé 2 h à 21 °C. Les coupes ont été lavées 3 fois avec du PBS 1X durant 10 min. Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal tel que décrit plus ci-dessous.

Microscopie

Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (Leica DM6000 CS). Les images présentant des tranches de cerveaux embryonnaires ont été prises à l'aide d'un objectif 10 X. Les images ont été prises à 0,5 µm d'intervalle avec l'outil «tilescan» du logiciel Leica Application Suite X, afin d'avoir une image complète du cerveau. Les images de cortex somatosensitif ont été prises avec l'objectif 20 X à 1,0 µm d'intervalle entre les images. L'outil «tilescan» a encore une fois été utilisé. Les images de colocalisation entre *Myo9b* et les interneurons ont été prises à 63X à zoom 2 avec 0,5 µm d'intervalle entre chaque image. Finalement, les images de neurones ont été prises à l'aide d'un objectif 63 X à 0,5 µm d'intervalle avec le logiciel Leica Application Suite X. Les neurones ont été reconstruits à l'aide du logiciel NeuroLucida 10 et les données ont été analysées avec le logiciel NeuroLucida Explorer 10.

Résultats

Expression de la MYO9b dans les INs

Si la MYO9b joue un rôle important dans la migration des INs corticaux, elle devrait être exprimée par les INs embryonnaire en cours de migration. Dans le but de caractériser la localisation de cette protéine au niveau embryonnaire, j'ai réalisé une immunohistochimie sur des tranches de cerveau de souris $Dlx5/6^{cre};RCE^{EGFP}$ à e15.5. Le résultat est présenté à la figure 8. À ce stade embryonnaire, la majorité des INs est située dans les différentes structures embryonnaires ventrales, soit les éminences ganglionnaires et l'aire préoptique. Cependant, certains INs ont commencé leur migration et se retrouvent dans la plaque corticale (figure 8, A''). L'immunohistochimie révèle que *Myo9b* est bien exprimée au stade embryonnaire (figure 8, A'). La protéine est plus exprimée dans la zone manteau et moins exprimée près de la zone ventriculaire des éminences ganglionnaires. (figure 8, A'), ce qui suggère que MYO9b n'est pas requise durant la prolifération cellulaire et qu'elle commence à être exprimée lors de l'amorce de la migration.

La zone ventriculaire de la MGE montre une absence de EGFP, ce qui est conséquent avec une distribution du transgène $Dlx5/6^{Cre}$ suivant l'expression du facteur de transcription *Dlx5/6* qui n'est exprimé que lorsque les INs ont quitté la zone SVZ et atteignent la zone du manteau (« mantle zone ») (figure 8, C''). Comme de fait, il est possible de constater une forte expression de la EGFP dans cette zone. L'expression de la *Myo9b* dans la zone ventriculaire du MGE est très faible. Cependant, il est possible de voir quelques cellules exprimant *Myo9b* qui colocalisent avec NeuN. Ces neurones pourraient être des cellules progénitrices de la MGE. De plus, il est possible de voir de longs filaments de *Myo9b* (figure 8, C') reflétant l'expression de la protéine dans les vaisseaux sanguins.

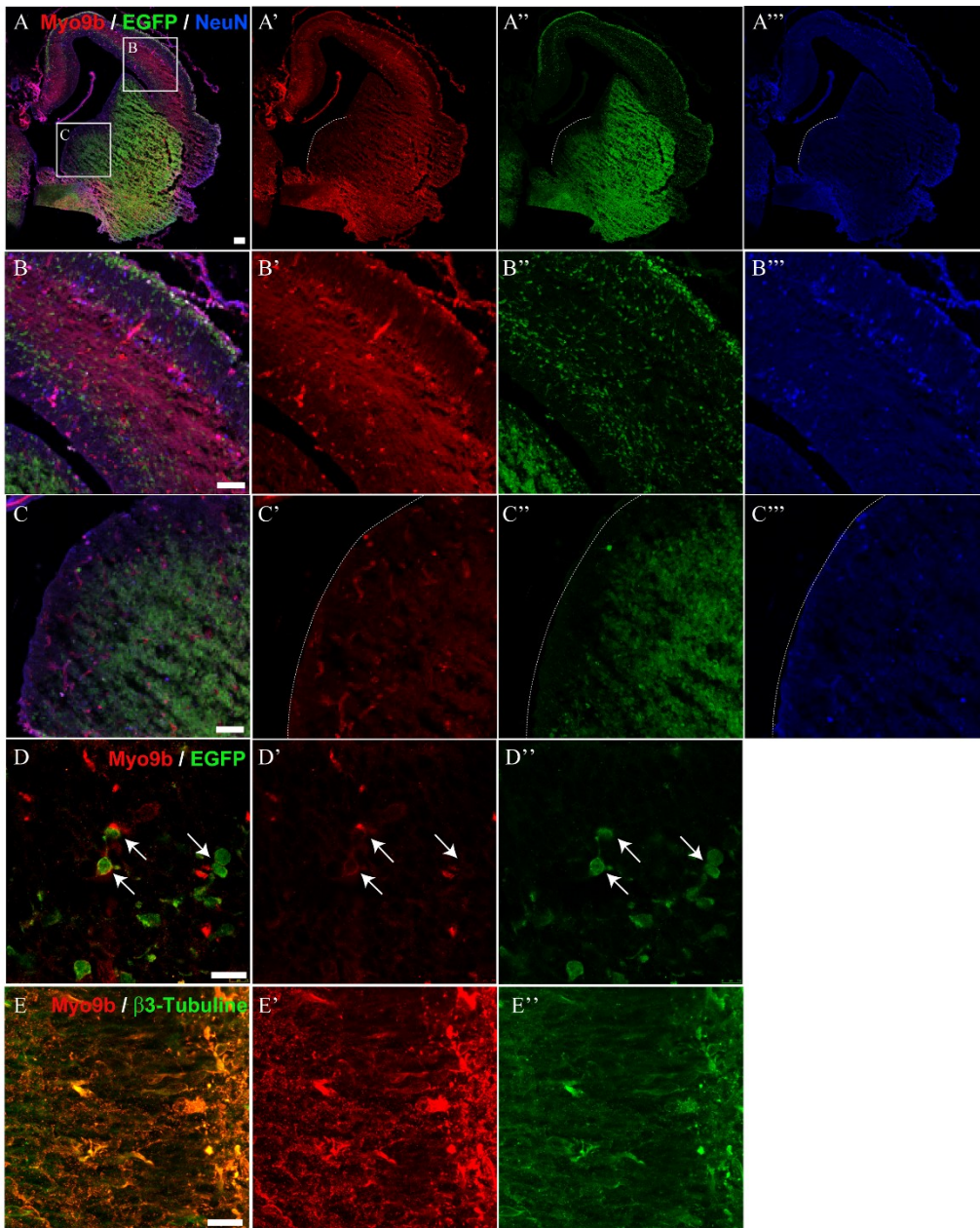


Figure 8 : Localisation embryonnaire de MYO9b. A-D : Imagerie par microscopie confocale d'une immunohistochimie sur des tranches corticales de cerveaux embryonnaires de souris *Dlx5/6^{cre};RCE^{EGFP}* à e15,5. Rouge : MYO9b (A', B', C'), vert : EGFP (A'', B'' et C'') et bleu : marqueur neuronal NeuN (A''', B''' et C'''). A : Présentation de la moitié du cerveau. B : Présentation de la plaque corticale. C : Présentation de la MGE. D : Colocalisation entre EGFP et MYO9b dans les cellules au niveau de la zone marginale. Rouge : MYO9b (D'), Vert : EGFP (D''). E : Imagerie par microscopie confocale d'une immunohistochimie sur des tranches

corticales de cerveau embryonnaire de souris de type sauvage à e15,5 de la MYO9b (E') et du marqueur neuronal β 3-Tubuline (E''). n=3 L'échelle est de 100 μ m (A), 50 μ m (B-C), 15 μ m (D) et 10 μ m (E).

Au niveau de la plaque corticale, il est possible de voir les voies de migration des INs (figure 8, B''). La quantification du nombre d'INs (marqués par la EGFP) exprimant la Myosine IXb révèle que $75,2 \pm 1,01$ % des INs de la plaque corticale colocalisent avec la MYO9b (n=3 animaux, à e15,5). Cette colocalisation est plus abondante dans la zone marginale et dans la zone sous-ventriculaire, soit respectivement $84,9 \pm 3,9$ % et $82,9 \pm 3,2$ % des INs marqués par la EGFP, mais la colocalisation est quand même importante dans la plaque corticale (PC) et dans la sous-plaque (SP) ($75,1 \pm 4,5$ % et $75,6 \pm 2,5$ % des INs marqués par la EGFP). Ceci suggère que la MYO9b est importante pour la migration des INs, tant au niveau de la migration tangentielle que de la migration radiale.

La distribution cellulaire de MYO9b est différente de celle de la EGFP. En effet, la EGFP est localisée majoritairement dans le soma et le noyau des INs. Sa localisation est très bien définie, de sorte qu'il est facile d'identifier chacun des INs. Contrairement à la EGFP, la MYO9b est distribuée de façon plus diffuse dans les INs. Elle n'est pas exprimée dans le noyau cellulaire, mais semble être localisée dans le cytoplasme somatique des INs (figure 8, D'). De plus, l'expression de MYO9b ne semble pas exclusive aux INs. Comme de fait, il est possible de voir la forme de plusieurs cellules qui ne sont pas marquées à la EGFP. La localisation de MYO9b dans les cellules suggère qu'elle aurait un rôle plutôt cytosolique que nucléaire.

Dans le but de déterminer si la MYO9b joue un rôle dans le remodelage du cytosquelette des neurones durant leur migration, une immunohistochimie a été faite sur des cerveaux d'embryons de souris de type sauvage à e15.5. De façon intéressante, au stade embryonnaire, la MYO9b colocalise fortement avec la tubuline dans la plaque corticale. La β 3-tubuline est une forme de la tubuline exprimée exclusivement dans les neurones. Cette colocalisation montre donc que MYO9b est localisée au pourtour des neurones selon un motif similaire à la tubuline (figure 8, E). Ainsi, cela suggère que la MYO9b pourrait avoir un rôle dans le remodelage du cytosquelette des neurones en migration.

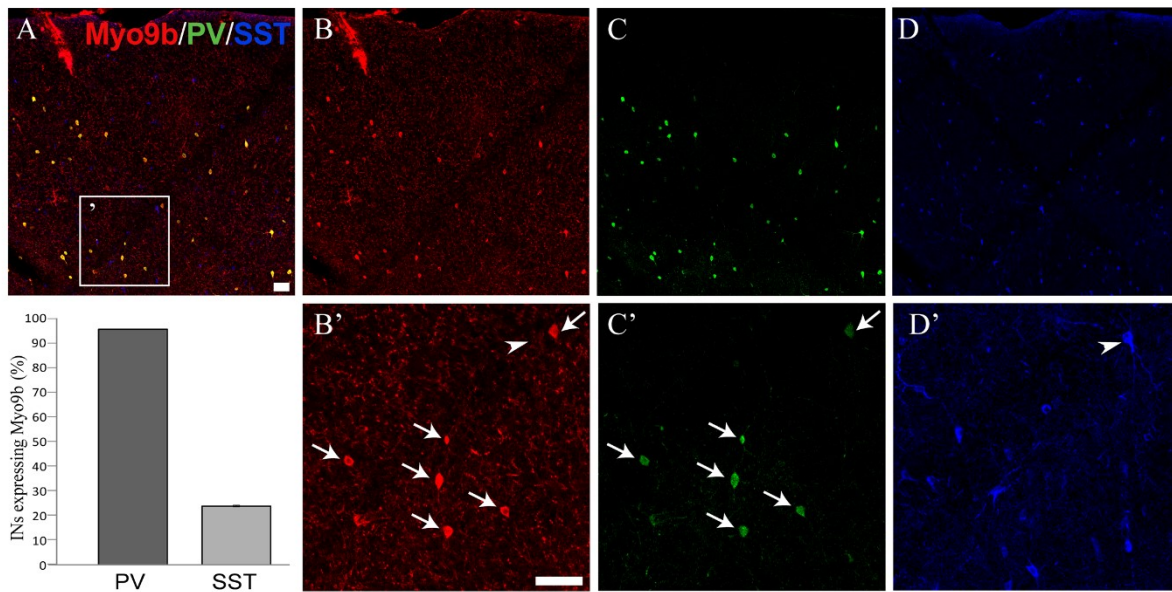


Figure 9 : Localisation de MYO9b dans le cerveau adulte. A : Imagerie par microscopie confocale d'une immunohistochimie sur des coupes corticales de cerveau de souris $G42^{EGFP}$ à P60. B, B' : MYO9b, C, C' : EGFP exprimée dans les cellules PV (n=5). D, D' : SST (n=3). L'échelle est de 50 μ m. Les têtes de flèches représentent la colocalisation des cellules SST et de MYO9b et les flèches complètes représentent la colocalisation de PV avec Myo9b. Le graphique représente le pourcentage de cellules PV ou de cellules SST qui colocalisent avec MYO9b.

Dans le but de vérifier si l'expression de *Myo9b* était maintenue dans les INs du cerveau adulte, une immunohistochimie a été réalisée sur le cortex somatosensitif de cerveaux de souris $G42^{EGFP}$ à P60. Chez ces souris, seuls les INs exprimant la PV sont marqués génétiquement par la EGFP. Les résultats sont présentés à la figure 9. Cette expérience démontre que l'expression de *Myo9b* persiste à l'âge adulte. De façon intéressante, la MYO9b colocalise principalement avec la PV (figure 9, B' et C'). En effet, $95,6 \pm 1,8$ % des cellules exprimant la PV expriment aussi la MYO9b (n=5 animaux, âgés de P60) (Figure 9, graphique). Cependant, la colocalisation entre MYO9b et la SST est beaucoup moins fréquente (Figure 9, B' et D'). Ainsi, seulement $24,1 \pm 1,2$ % des cellules exprimant la SST expriment aussi la MYO9b (n=3 animaux, âgés de P60) (Figure 9, graphique). Enfin, il est possible de voir des cellules marquées par la MYO9b

qui ne colocalisent ni avec la PV, ni avec la SST. Ainsi, ces cellules pourraient être d'autres types d'INs provenant du CGE ou du POa, ou des cellules pyramidales. Cependant, le motif de distribution de MYO9b dans le cortex, de façon mosaïque et transcortical est plus suggestif d'une expression dans les INs que dans les cellules pyramidales, puisque ces dernières sont ubiquitaires et qu'on s'attendrait à une distribution beaucoup plus uniforme ou par couche laminaire si la protéine était exprimée dans les cellules pyramidales. Les résultats suggèrent que l'expression de MYO9b n'est pas essentielle à tous les types d'INs adultes, mais pourrait jouer un rôle important au niveau des cellules PV qui représentent la majorité des INs corticaux.

MYO9b est principalement exprimée au niveau du soma des INs matures. Il est cependant possible de voir une légère expression dans les noyaux cellulaires. De plus, contrairement à son expression au stade embryonnaire, la MYO9b ne se retrouve pas au niveau des neurites des INs matures et on note peu de localisation de la protéine dans les axones ou dans les dendrites des INs. Ces résultats suggèrent que MYO9b pourrait participer au remodelage des neurites des INs en migration, mais que son rôle diffère dans les INs matures puisqu'elle se localise au soma et au niveau du noyau cellulaire.

En résumé, ces expériences ont permis de caractériser l'expression embryonnaire et adulte de la MYO9b à e15,5 et à P60. Ainsi, la MYO9b est exprimée dès l'âge embryonnaire. Son expression est plus marquée dans le soma des INs en migration et est maintenue du début de la migration tangentielle jusque durant la migration radiale, lorsque les INs se distribuent au travers les différentes couches corticales. De plus, MYO9b colocalise fortement avec la β -tubuline, ce qui suggère un rôle de MYO9b au niveau du remodelage du cytosquelette. Avec son rôle connu dans le remodelage du cytosquelette dans d'autres types de cellules telles les cellules immunitaires et sa localisation embryonnaire, la Myo9b pourrait jouer un rôle important dans la migration des INs, et ceci sera exploré dans les expériences décrites dans le reste de ce mémoire. De plus, l'expression de MYO9b est maintenue dans les INs matures, avec un biais pour les cellules PV.

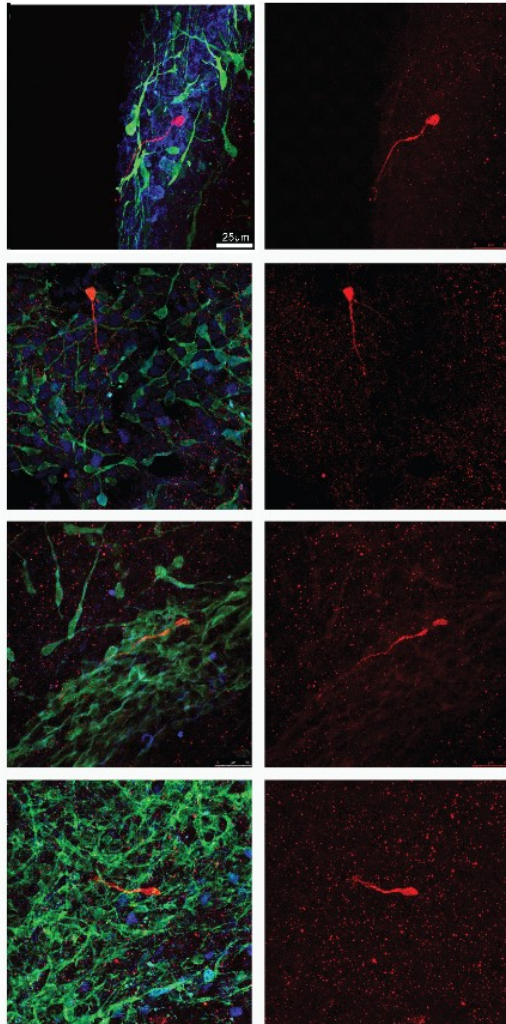
Répression sélective de *Myo9b* dans les INs embryonnaires

Puisque la MYO9b est exprimée au stade embryonnaire dans les INs et qu'elle colocalise avec la β 3-Tubuline, il est possible de se demander si cette protéine joue un rôle dans la migration des INs. Dans le but de vérifier l'importance de cette protéine dans la migration des INs, une répression sélective de l'expression de *Myo9b* a été effectuée à l'aide d'un shARN ciblant l'ARN messager de *Myo9b* sous le contrôle du promoteur *Dlx5/6*. La séquence du shARN ciblant *Myo9b* a été publiée précédemment et est spécifique et efficace pour réprimer l'expression de *Myo9b* dans les neurones pyramidaux et dans les macrophages (128). Les plasmides exprimant le shARN ciblant *Myo9b* ou un shARN témoin brouillé (shARN6 : scramble) ont été transfectés par électroporation *ex vivo* dans la MGE de cerveaux embryonnaires de souris *Dlx5/6^{cre};RCE^{EGFP}* à e13,5. Nous avons choisi cet âge embryonnaire puisqu'il correspond à l'âge de la production maximale d'INs issus de la MGE, en particulier des INs exprimant la PV qui expriment *Myo9b* de façon soutenue, tel que démontré précédemment. Les cerveaux ont ensuite été tranchés au vibratome pour obtenir des tranches de 250 μ m qui ont été incubées à 37°C pendant 72 h, le temps requis pour que les INs transfectés atteignent la plaque corticale. Ainsi, il a été possible de comparer la morphologie des cellules exprimant le shARN anti-*Myo9b* à celle des cellules exprimant le shARN témoin ainsi qu'à celle d'INs non transfectés. Les résultats sont présentés à la figure 10. La morphologie des cellules *Myo9b^{kd}* est très différente de celle des cellules de type sauvage exprimant le shARN témoin. Comme de fait, les cellules mutantes ont un aspect multipolaire, c'est-à-dire qu'elles ne semblent pas avoir un pôle rostral et un pôle caudal clair. Les INs en migration sont habituellement bipolaires. Ils ont un pôle antérieur vers lequel ils migrent et un pôle postérieur, tel qu'observé dans les INs transfectés avec le plasmide contrôle.

A)

Control

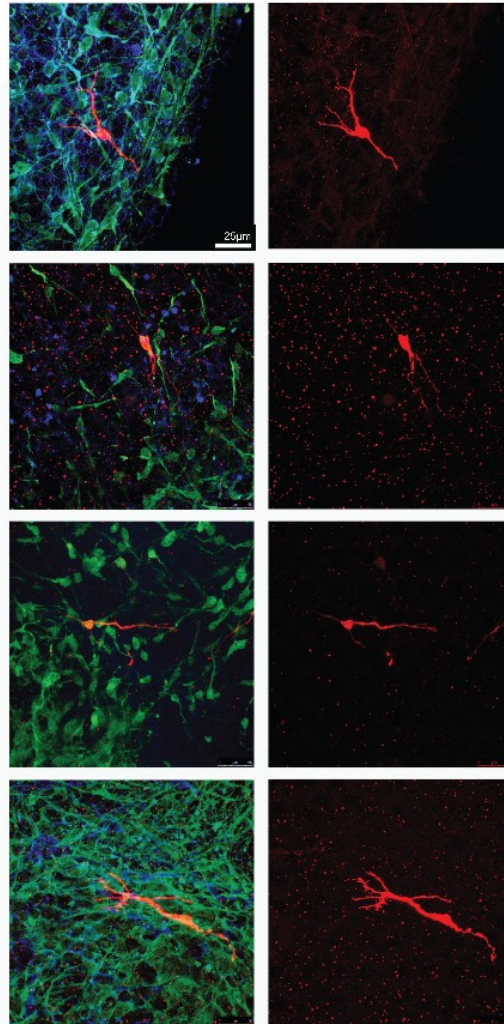
GFP tdTomato NeuN



B)

Myo9b^{kd}

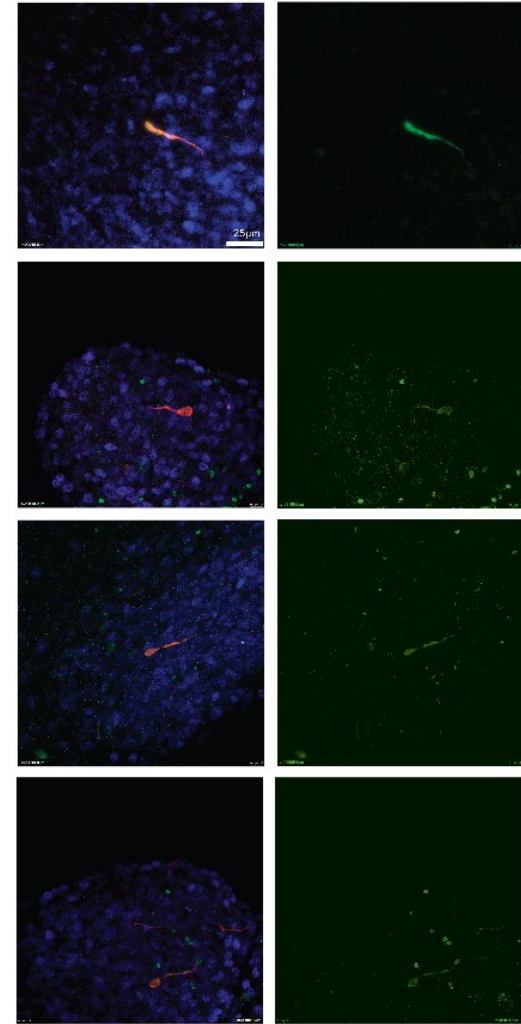
GFP tdTomato NeuN



C)

Rescue

TdTomato GFP NeuN



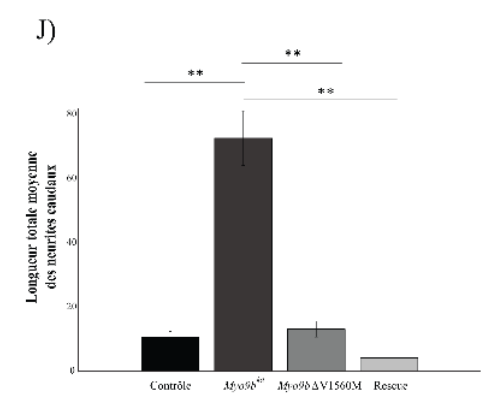
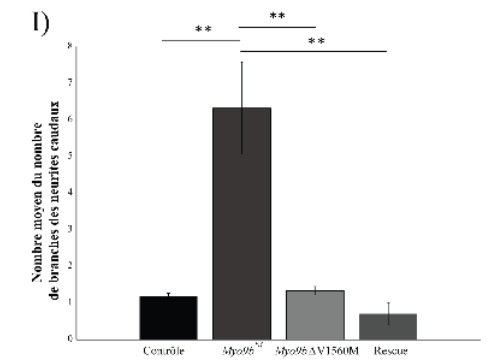
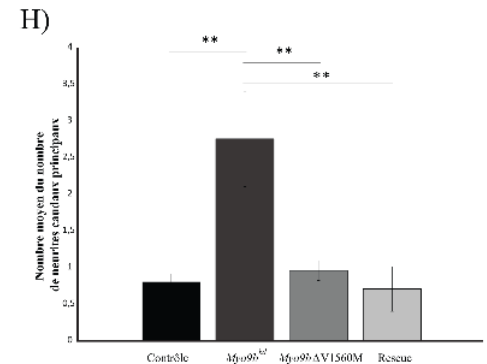
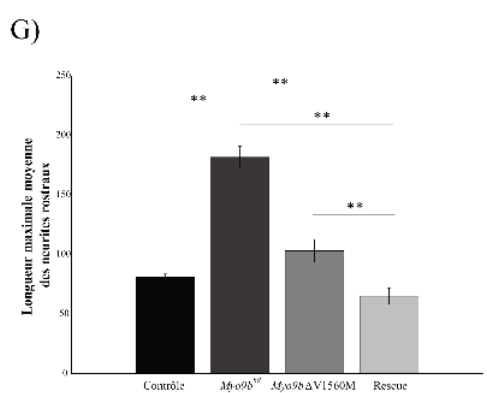
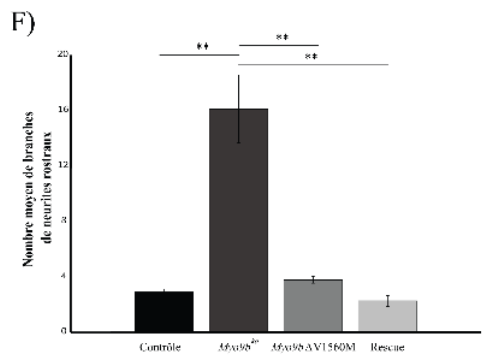
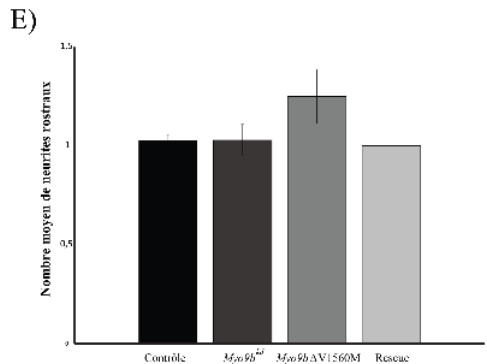
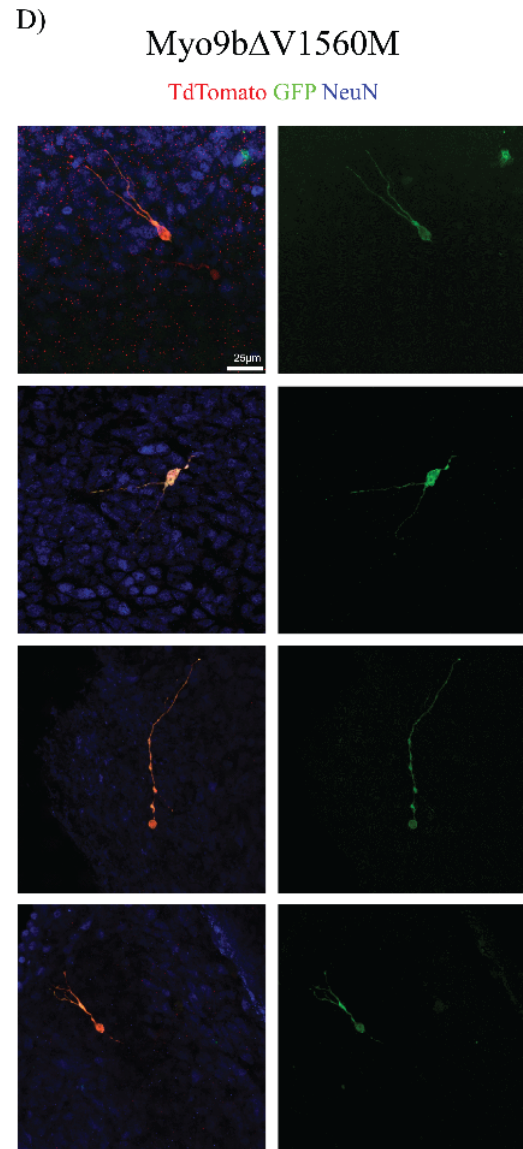


Figure 10 : La répression de *Myo9b* altère la morphologie des INs en migration.

A : morphologie des cellules témoins obtenues par électroporation du MGE avec le shARN témoin. B : morphologie des cellules *Myo9b^{kd}* obtenues par électroporation du MGE avec le shARN ciblant *Myo9b*. A-B : Rouge : tdTOMATO (cellules électroporées), Vert : EGFP, Bleu : marqueur neuronal NeuN. C : Expérience de sauvetage du phénotype. Co-électroporation de shARN ciblant *Myo9b* et de l'ADNc de *Myo9b*. D : Expérience de sauvetage du phénotype avec l'ADN muté. Co-électroporation de shARN ciblant *Myo9b* et de l'ADNc de *Myo9b* contenant la mutation V1560M. C-D : Rouge : tdTOMATO (cellules exprimant le shARN ciblant *Myo9b*), Vert : EGFP (cellules exprimant l'ADNc de *Myo9b* sain (C) ou avec mutation (D)), Bleu : Marqueur neuronal NeuN. E : Nombre de neurite rostraux principaux. F : Nombre de branches des neurites rostraux (ANOVA à un critère de classification : $p = 5,42 \times 10^{-7}$). G : Longueur moyenne totale des neurites rostraux ANOVA à un critère de classification : $p = 2,22 \times 10^{-8}$) H : Nombre de neurites caudaux principaux (ANOVA à un critère de classification : $p = 0,003$). I : Nombre de branches chez les neurites caudaux (ANOVA à un critère de classification : $p = 2,11 \times 10^{-5}$) et J : Longueur moyenne totale des neurites caudaux principaux (ANOVA à un critère de classification : $p = 8,58 \times 10^{-9}$). Noir : témoin, gris foncé : *Myo9b^{kd}*, gris : *Myo9b^{ΔV1560M}* et gris pâle : le sauvetage. Les barres d'erreur sont de 25 μm .

Plusieurs paramètres ont été mesurés sur les INs ayant atteint la plaque corticale afin de quantifier les changements morphologiques. Le premier paramètre mesuré est le nombre de neurites rostraux. Ces neurites partent du corps cellulaire et se projettent vers l'avant. Ils vont former des branches afin d'échantillonner l'environnement, à la recherche d'indices attracteurs et répulsifs, puis une de ces branches sera consolidée et les autres seront rétractées afin d'orienter la cellule vers le gradient chimiotactile favorable. Les cellules de type sauvages exprimant le shARN témoin ($n = 5$ cerveaux, 29 cellules) ont en moyenne $1,03 \pm 0,03$ neurite rostral principal (Figure 10, E). De façon similaire, les cellules *Myo9b^{kd}* ($n = 5$ cerveaux, 20 cellules) ont en moyenne $1,12 \pm 0,08$ neurite rostral principal (Figure 10, E). Cependant, ce neurite rostral principal forme un nombre beaucoup plus important de branches que le neurite rostral principal des cellules témoins. En effet, les cellules *Myo9b^{kd}* ont en moyenne $16,10 \pm$

2,45 branches contre $2,91 \pm 0,22$ branches pour les cellules témoins (ANOVA à un critère de classification avec correction post-hoc de Tukey : $p = 5,42 \times 10^{-7}$, Figure 10, F). Une autre différence marquée dans la morphologie de ces INs est la longueur totale des neurites rostraux. Les neurites rostraux des cellules *Myo9b^{Kd}* ont une longueur totale moyenne de $181,84 \pm 9,40$ μm , soit une longueur totale beaucoup plus élevée que celle des cellules témoins qui est de $81,16 \pm 2,68$ μm (ANOVA à un critère de classification avec correction post-hoc de Tukey : $p = 2,22 \times 10^{-8}$, Figure 10, G). Ces résultats suggèrent que la répression de *Myo9b* altère la morphogénèse des INs en migration. Ceci pourrait avoir un impact sur l'aspect dynamique de la migration des INs puisque la morphologie de leur neurite rostral n'est pas optimale pour une bonne migration, démontrant un déficit de rétraction des branchements non privilégiés, et possiblement un déficit dans l'échantillonnage de l'environnement à la recherche d'indices chimio-attracteurs.

Les mêmes paramètres ont été mesurés sur les neurites caudaux. Ces neurites sont les prolongations caudales présentes après la nucléokinèse. De façon intéressante, le nombre de neurites caudaux principaux est grandement augmenté à la suite de la répression de *Myo9b*. Ainsi, les cellules *Myo9b^{Kd}* ($n = 5$ cerveaux, 20 cellules) présentent en moyenne $2,76 \pm 0,65$ neurites caudaux principaux contrairement aux cellules témoins ($n = 5$ cerveaux, 29 cellules) qui en présentent en moyenne $0,8 \pm 0,11$ (ANOVA à un critère de classification avec correction post-hoc de Tukey : $p = 0,003$, Figure 10, H). Ainsi, chez les témoins, les neurites caudaux principaux ne sont pas présents chez tous les INs, tandis qu'il y en a en moyenne plus de 2 chez les cellules réprimées. De plus, chez les cellules témoins, les neurites caudaux principaux ont en moyenne $1,19 \pm 0,08$ branche. Le nombre de branches était toutefois augmenté chez les cellules *Myo9b^{Kd}* à $6,32 \pm 1,26$ branches (ANOVA à un critère de classification avec correction post-hoc de Tukey : $p = 2,11 \times 10^{-5}$, Figure 10, I). Finalement, la longueur totale de ces neurites passait de $10,89 \pm 1,64$ μm chez les cellules témoins à $72,74 \pm 8,48$ μm chez les cellules *Myo9b^{Kd}* (ANOVA à un critère de classification avec correction post-hoc de Tukey : $p = 8,58 \times 10^{-9}$, Figure 10, J). Ces résultats suggèrent que la répression de *Myo9b* pourrait perturber la migration des interneurons par l'incapacité d'effectuer une rétraction optimale des neurites caudaux.

Afin de déterminer si la répression de *Myo9b* diminue la capacité des INs à atteindre la plaque corticale, j'ai quantifié le nombre de cellules *Myo9b^{Kd}* et le nombre de cellules témoins qui

atteignent le cortex sur le nombre total de cellules électroporées après 72 heures en culture. Ainsi, le pourcentage de cellules témoins qui atteignent le cortex n'est pas significativement différent de celui des cellules *Myo9b^{kd}* qui l'atteignent, soit d'environ 16 % chez les témoins et 14 % chez les INs après répression de *Myo9b* (n=3). Cependant, chez les cellules *Myo9b^{kd}*, les cellules qui n'atteignent pas le cortex sont les cellules qui semblent les plus multipolaires. Ceci suggère que malgré la baisse d'expression de *Myo9b*, les cellules sont capables de migrer jusqu'à la plaque corticale dans une proportion similaire aux cellules témoins, mais que la répression possiblement plus forte dans certaines cellules altèrent leur morphologie et limite leur migration vers la plaque corticale. Enfin, le faible nombre de cellules électroporées ne nous permet pas d'évaluer la distribution finale des INs modifiés génétiquement au sein de la plaque corticale.

Pour vérifier la spécificité du shARN, une expérience de sauvetage du phénotype a été effectuée. Ainsi, l'ADN codant pour la protéine MYO9b et résistant au shARN a été co-électroporé avec le plasmide contenant le shARN. Les mêmes paramètres morphologiques ont été mesurés. Les cellules électroporées avec l'ADNc sauvage résistant au shARN ont un phénotype semblable à celui des cellules témoins, tel que présenté dans la figure 10. Ainsi, ces cellules ont un seul neurite rostral (n = 6 cerveaux, 14 cellules, Figure 10, E). Ce neurite a en moyenne $1,25 \pm 0,40$ branches et a une longueur totale de $65,3 \pm 6,78 \mu\text{m}$ (Figure 10, F et G). Ces données ne sont pas significativement différentes de celles des cellules témoins, mais sont significativement différentes de celles des cellules *Myo9b^{kd}*. Pour ce qui est des neurites caudaux, les cellules électroporées avec l'ADNc sauvage résistant au shARN avaient en moyenne $0,71 \pm 0,31$ neurite caudal principal (Figure 10, H). Ces neurites ne faisaient pas de branches. Ainsi, le nombre total de branches de ces neurites caudaux est de $0,71 \pm 0,31$ (Figure 10, I). Finalement, la longueur totale de ces neurites est de $4,24 \pm 1,66 \mu\text{m}$ (Figure 10, J). Ainsi, les cellules électroporées avec l'ADNc résistant au shARN sont identiques aux cellules témoins et significativement différentes des cellules *Myo9b^{kd}*. Ces résultats suggèrent que le shARN ciblant *Myo9b* est spécifique à cet ARN messager, puisqu'il a été possible de faire le sauvetage du phénotype avec l'ADN codant pour *Myo9b* et résistant au shARN.

Effet de la mutation du patient

Afin de déterminer si la mutation du gène *MYO9B*, retrouvée chez le patient atteint d'une encéphalopathie épileptogène aurait pu causer un défaut de migration des INs corticaux et induire l'épilepsie, une expérience de sauvetage avec l'ADN muté a été réalisée. Ainsi, l'ADN codant pour *Myo9b*, résistant au shARN et portant la mutation d'une valine pour une méthionine au codon 1560 a été co-électroporé avec le shARN ciblant la *Myo9b*. Les cellules obtenues avaient un changement de morphologie beaucoup moins marqué que les cellules *Myo9b^{kd}*, tel que présenté à la figure 10.

Comme les cellules témoins, les cellules *Myo9b^{AV1560M}* avaient une moyenne de $1,25 \pm 0,14$ neurite rostral principal (n = 5 cerveaux, 25 cellules, Figure 10, E). Ces neurites avaient en moyenne $3,78 \pm 0,25$ branches, soit un nombre de branches significativement moins élevé que les cellules *Myo9b^{kd}*, mais non statistiquement différent du nombre de branches des cellules témoins et des cellules sauvetages (ANOVA à un critère de classification avec correction post-hoc de Tukey : $p = 5,43 \times 10^{-7}$, Figure 10, F). De plus, la longueur moyenne totale des neurites rostraux des cellules *Myo9b^{AV1560M}* est de $103,36 \pm 21,5 \mu\text{m}$ (Figure 10, G). Cette valeur est non statistiquement différente de celle des cellules témoins. Cependant, la longueur moyenne totale des neurites rostraux des cellules contenant la mutation du patient est significativement différente des cellules *Myo9b^{kd}* et des cellules sauvetages (ANOVA à un critère de classification avec correction post-hoc de Tukey : $p = 2,22 \times 10^{-8}$).

Les mêmes paramètres ont été mesurés au niveau des neurites caudaux. Ainsi, les cellules *Myo9b^{AV1560M}* présentent une moyenne de $0,96 \pm 0,14$ neurites caudaux, soit un nombre similaire aux cellules témoins et aux cellules sauvetages, mais significativement moins élevé que les cellules *Myo9b^{kd}* (ANOVA à un critère de classification avec correction post-hoc de Tukey : $p = 0,003$, Figure 10, H). Ces cellules ont un nombre moyen de branches semblable aux cellules témoins et aux cellules sauvetages, soit de $1,34 \pm 0,12$ branches (Figure 10, I). Cependant, ce nombre est encore une fois significativement inférieur au nombre moyen de branches des cellules *Myo9b^{kd}* (ANOVA à un critère de classification avec correction post-hoc de Tukey : $p = 2,11 \times 10^{-5}$). Finalement, la longueur moyenne totale des neurites caudaux est de $13,21 \pm 5,52 \mu\text{m}$ chez les cellules *Myo9b^{AV1560M}* (Figure 10, J). Ces neurites ont une longueur

moyenne similaire à ceux des cellules témoins et des cellules sauvetages. Cependant, ils sont statistiquement moins longs que les neurites caudaux des cellules *Myo9b^{kd}* (ANOVA à un critère de classification avec correction post-hoc de Tukey : $p = 8,58 \times 10^{-9}$). Ces résultats suggèrent que le cDNA de *Myo9b* portant la mutation du patient permet de faire un sauvetage du phénotype retrouvé chez les cellules *Myo9b^{kd}*. Ainsi, la mutation du patient n'aurait pas d'impacts sur la morphologie des cellules en migration selon les paramètres étudiés.

Discussion

Expression de MYO9b par les INs en développement et par les INs matures

Dans cette étude, j'ai démontré pour la première fois que MYO9b est une protéine très importante pour la morphogénèse des INs corticaux en migration et que sa répression perturbe grandement leur morphologie. Mes résultats démontrent pour la première fois que MYO9b est exprimée tôt dans le développement embryonnaire murin et que son expression est maintenue jusqu'à l'âge adulte. Comme de fait, il est mentionné dans la littérature que MYO9b est exprimée dans la plaque corticale au cours du développement embryonnaire et que son expression, même si elle diminue à l'âge adulte, perdure dans le cortex des rats (128). Chez la souris, MYO9b est déjà présente dans le cerveau à E15,5 et ce, non seulement dans la plaque corticale, mais aussi dans les éminences ganglionnaires et dans la zone du manteau. Ainsi, MYO9b pourrait être un joueur clef du développement de plusieurs types de cellules nerveuses. En effet, l'importance de cette protéine pour le développement dendritique des neurones pyramidaux du cortex a été démontrée récemment. Ainsi, la répression de *Myo9b* par électroporation *in utero* à l'aide d'un ARN interférant induit une simplification de l'arbre dendritique des neurones de l'hippocampe postnatal (128). Cependant, le rôle de MYO9b dans les INs n'était pas connu.

Les résultats présentés dans ce mémoire démontrent, pour la première fois, que *Myo9b* est exprimée dans les INs tant à l'âge embryonnaire qu'à l'âge adulte. *Myo9b* est exprimée au stade embryonnaire dans les INs en migration, et ce, des éminences ganglionnaires à la plaque corticale. Ainsi, MYO9b pourrait être importante bien avant le développement dendritique des INs. De plus, *Myo9b* est exprimée dans les INs matures. À l'âge adulte, cette expression est beaucoup plus importante dans les cellules PV que dans les cellules SST.

Les cellules PV représentent environ 40% des INs corticaux. Elles sont la source d'inhibition la plus rapide, la plus précise et la plus forte du cortex et sont essentielles pour le maintien des rythmes corticaux (8). Puisque les cellules PV sont les INs les plus abondants dans le cortex, il

est possible de se demander si une baisse de l'expression de *Myo9b* pourrait mener à des défauts d'inhibition corticaux. Comme de fait, des défauts d'inhibition par les INs corticaux sont impliqués dans plusieurs troubles neuro-développementaux comme l'épilepsie, tant chez l'humain que chez la souris (8). Au stade adulte, MYO9b pourrait être importante pour maintenir l'intégrité de la structure de la cellule. MYO9b est principalement exprimée dans le soma cellulaire dans les INs PV adultes. De plus, MYO9b est une myosine importante dans la dynamique du cytosquelette d'actine (132, 134, 136). Une baisse d'expression de MYO9b dans les cellules immunitaires cause un changement dans leur morphologie et forme des cellules beaucoup plus arrondies (132). Ainsi, une perturbation de MYO9b dans les cellules PV pourrait affecter leur morphologie (soma et dendrite) et, par le même fait, affecter leur connectivité et fonction. Les travaux présentés dans ce mémoire portent sur l'impact de la répression de *Myo9b* dans les INs au stade embryonnaire. Cependant, l'impact de cette répression en postnatal sur la morphologie des INs PV adultes pourrait être vérifiée ultérieurement par répression génique de *Myo9b* dans des tranches corticales postnatales. En effet, il est possible d'effectuer cette répression dans des tranches corticales de cerveaux de souris à P5, puis en transfectant l'ADN contenant le shARN par biolystique à P8, en fixant à P30 et analysant par microscopie confocale et reconstruction neuronale les INs transfectés.

De plus, d'autres cellules semblent exprimer MYO9b. Afin de caractériser l'expression de *Myo9b* dans les cellules du cortex, il serait important de vérifier le type de cellules qui expriment cette protéine par immunohistochimies. Ainsi, il serait possible de confirmer que les cellules exprimant MYO9b dans le cortex de souris adultes sont bien des INs et non des cellules pyramidales ou gliales. Il serait possible de vérifier cette hypothèse par immunohistochimie de la GFP et de *Myo9b* sur des cerveaux adultes de souris *Dlx5/6^{cre};RCE^{EGFP}* dont tous les INs sont marqués par la GFP. Si toutes les cellules qui expriment *Myo9b* sont aussi GFP-positives, mon hypothèse sera confirmée.

Changements morphologiques des INs à la suite de la répression de *Myo9b*

La répression de *Myo9b* cause des changements morphologiques majeurs chez les INs en migration. Comme de fait, les cellules *Myo9b^{kd}* présentent des neurites rostraux qui ont un

nombre de branches et une longueur totale beaucoup plus élevés que ceux des cellules témoins. De plus, les cellules *Myo9b^{kd}* présentent un nombre plus élevé de neurites caudaux qui sont plus longs et plus fortement branchés que ceux des cellules témoins. La correction du phénotype cellulaire à l'aide d'un cDNA résistant au shARN suggère que les modifications morphologiques observées sont effectivement dues à une répression de l'expression de *Myo9b* et ne sont pas simplement le reflet d'effets non-spécifiques du shARN.

Les résultats morphologiques obtenus dans mes expériences sont étonnants si on les compare à la morphologie simplifiée des cellules immunitaires obtenues après répression de *Myo9b*. Cependant, cette différence morphologique peut être expliquée par le type de cellules étudiées. Comme de fait, dans les cellules immunitaires, la baisse d'expression de *Myo9b* cause une diminution de la dynamique des filaments d'actine. Ces cellules ont une morphologie beaucoup plus arrondie, puisqu'elles établissent des filopodes sans lamellipodes, et elles ont une motilité réduite (136). Il est possible qu'une diminution de la dynamique des filaments d'actine dans les INs n'altère pas l'extension des neurites, mais qu'elle induise plutôt un défaut de rétraction des branches excédentaires des neurites rostraux et caudaux. Par opposition, chez les cellules cancéreuses, l'augmentation de l'expression de *MYO9b* augmente la motilité des cellules et, ainsi, leur vitesse de migration, mais ne semble pas perturber leur morphologie (133, 135).

Les changements de morphologie observés après répression de *Myo9b* dans les INs pourraient refléter une perturbation de la cascade signalétique de la MYO9b, en particulier en lien avec son rôle dans le remodelage de l'actine. En effet, MYO9b joue un rôle direct dans la dynamique de l'actine (137). MYO9b a un domaine de liaison à l'actine et la famille des myosines est déjà bien connue pour interagir avec l'actine (130). Comme de fait, MYO9b lie l'extrémité positive des filaments d'actine et catalyse l'hydrolyse de Rho-GTP par sa queue GAP. Ainsi, MYO9b inactive RhoA via sa queue GAP (137). RhoA est une kinase qui permet l'activation de la kinase ROCK. Cette protéine kinase permet la phosphorylation de la MLC et l'inactivation de la MLCP, permettant la contraction des fibres d'actine par l'activation de la myosine II. De plus, RhoA active la kinase LIMK, qui inhibe la cofiline, une protéine qui promeut la dépolymérisation de l'actine (Figure 5) (132). L'inhibition de *Myo9b* mène donc à une suractivation de RhoA qui stabiliserait les filaments d'actine, ce qui pourrait expliquer les défauts de rétraction des neurites. De plus, RhoA est une protéine importante pour la

polarisation cellulaire (138). Comme de fait, les cellules immunitaires n'exprimant pas la MYO9b avaient des défauts de la polarisation cellulaire résultant en des cellules rondes incapables de former de lamelipodes (136).

Les défauts de polarisation pourraient être caractérisés par une morphologie différente dans les cellules neuronales et dans les cellules immunitaires. Effectivement, de façon normale, au niveau neuronal, une diminution de l'activation de RhoA induit la polarisation des neurones, passant d'une cellule multipolaire à une cellule bipolaire (139). Cette polarisation est essentielle à la migration des cellules neuronales, puisqu'elle permet aux neurones de suivre un gradient chimiotactile. Ainsi, par l'inhibition de RhoA, MYO9b pourrait favoriser la polarisation des INs en migration. À l'inverse, une diminution d'expression de MYO9b pourrait engendrer une morphologie multipolaire et ainsi, perturber la migration des neurones. En accord avec cette hypothèse, les INs *Myo9b^{kd}* en migration semblent multipolaires, c'est-à-dire qu'ils semblent ne pas avoir un pôle antérieur et un pôle postérieur clair et forment plusieurs neurites au départ du corps cellulaire.

La morphologie multipolaire des INs *Myo9b^{kd}* ressemble beaucoup à la morphologie des cellules pyramidales multipolaires *PIWIL1^{kd}*. Ces cellules présentent un nombre de neurites primaires plus élevé que les cellules de type sauvage, sans faire la différence entre les neurites rostraux et caudaux. De plus, les images fournies par les auteurs suggèrent que ces neurites font plus de branches (140). *PIWIL1* est impliquée dans la stabilisation et dans l'expression des microtubule-associated proteins (MAPs), protéines qui régulent la dynamique des MTs. Une baisse d'expression de *PIWIL1* mène à une moins grande expression de MAPs et ainsi, à des cellules multipolaires. Dans les cellules *Myo9b^{kd}*, l'augmentation de l'activité de RhoA causée par la baisse d'expression de MYO9b est la cause la plus probable de la mauvaise polarisation des INs qui expliquerait le nombre de neurites élevés. Cependant, il est aussi possible qu'une interaction entre MYO9b et les MTs soit essentielle pour la polarisation cellulaire. Ainsi, une baisse de MYO9b causerait des défauts au niveau des MTs perturbant la polarisation cellulaire. Des études fonctionnelles seront nécessaires pour valider cette hypothèse.

Les INs en migration expriment fortement le récepteur ROBO (82). Ce récepteur est important puisqu'il lie la chimiokine attractive SLIT. Ainsi, la cellule est capable de suivre le gradient

chimiotactile de SLIT. Une étude a récemment démontré, dans des cellules cancéreuses du poumon, une interaction entre le récepteur ROBO et la MYO9B permettant une régulation plus précise de RhoA (133). Ainsi, en interagissant avec ROBO, MYO9b devient inactive, ce qui permet une activation plus élevée de la protéine RhoA et donc moins de migration des cellules cancéreuses (133). Au niveau neural, cette interaction pourrait aussi avoir lieu. Ainsi, la liaison entre ROBO et SLIT mènerait à l'inactivation de MYO9b et à l'augmentation de l'activité de RhoA, permettant la stabilisation du neurite rostral principal qui suit le gradient chimiotactile et l'orientation de l'IN dans la bonne direction. Il se peut que la répression de *Myo9b* empêche l'interaction entre MYO9b et ROBO. Ainsi, la liaison de SLIT au récepteur ROBO ne permettrait pas d'inactiver MYO9b, et donc, la protéine RhoA resterait moins active dans les neurites rostraux. Une diminution de RhoA mène à une augmentation de la dynamique de l'actine, ce qui expliquerait le nombre de branches plus élevé.

En regardant du côté des MTs, aucune association entre MYO9b et la tubuline n'a encore été explorée. Cependant, mes résultats démontrent que MYO9b colocalise avec la β 3-tubuline au stade embryonnaire. Puisque MYO9b a un domaine GAP, il est possible que cette protéine interagisse aussi avec la tubuline. La colocalisation entre MYO9b et la β 3-tubuline pourrait signifier un rôle de MYO9b dans la dynamique des MTs. La tubuline libre est liée au GTP. Lorsqu'elle est incorporée aux MTs, la GTP est hydrolysée en GDP, rendant la tubuline beaucoup moins stable, ce qui favorise la dépolymérisation. Durant la migration des INs, les MTs permettent l'extension et la rétraction des neurites rostraux et caudaux, ainsi que la nucléokinèse (103). MYO9b pourrait favoriser la dépolymérisation des MTs en hydrolysant la GTP liée à la tubuline en GDP et ainsi favoriser la rétraction des neurites rostraux et caudaux. Comme de fait, les cellules *Myo9b^{kd}* semblent avoir des neurites beaucoup plus longues ce qui pourrait être dû à un défaut de rétraction. Ces défauts pourraient être mis en évidence avec l'imagerie en temps réel. Ainsi, en co-électroporant le shARN ciblant (ARNm) *Myo9b* et la tubuline marquée à la GFP, il serait possible de voir si MYO9b est importante pour la dynamique des MTs en regardant la polymérisation et la dépolymérisation de la tubuline. Ainsi, il sera possible de vérifier si le réseau de MTs est instable lorsque *Myo9b* est réprimée. Une dynamique perturbée pourrait signifier une interaction directe entre MYO9b et la tubuline qui pourrait être confirmée par des études de co-immunoprécipitation. Ainsi, une co-précipitation

de MYO9b avec la tubuline signifierait une interaction entre ces deux protéines. La nature de cette interaction pourrait être étudiée par la suite.

Enfin, mes résultats suggèrent que certains INs *MYO9b^{kd}* sont capables de migrer vers le cortex. Cependant, puisque les INs modifiés qui prennent une apparence multipolaire tendent à rester près de la MGE, il est possible que le degré de répression de *Myo9b* diffère d'une cellule à l'autre (par exemple selon le nombre de copies du plasmide électroporé dans chaque IN). Il serait intéressant de vérifier le niveau de *Myo9b* résiduel dans les INs électroporés, par exemple par le biais de rtPCR unicellulaire (single-cell).

De plus, il est possible que les INs qui arrivent à migrer vers la plaque corticale aient une motilité réduite ou un chemin de migration différent ou que cette migration prenne beaucoup plus de temps que celle des cellules témoins. Cela pourra être vérifié ultérieurement par microscopie en temps réel puisque nous pourrons alors quantifier la vitesse et la trajectoire de migration des INs, par exemple en imageant les INs électroporés de façon sériée à toutes les 15 minutes sur une période de quelques heures.

*L'effet de la mutation *Myo9b*ΔV1560M sur les INs en migration*

La mutation identifiée par l'équipe de la Dre Rossignol chez un patient atteint d'encéphalopathie épileptogène est une substitution d'une méthionine pour une valine à la position 1560 du gène *MYO9B*. Cette mutation, prédite pathogène par les scores PolyPhen et SIFT, est présente dans le segment compris entre les domaines IQ et le domaine GAP de la protéine MYO9b. Cette portion de protéine n'a pas encore de rôle défini, mais pourrait permettre des interactions spécifiques avec des protéines importantes pour le développement des INs. Les paramètres observés chez les INs *Myo9b^{ΔV1560M}* ne sont pas significativement différents de ceux des cellules témoins. Le changement d'acide aminé ne doit pas être crucial à la stabilité de la protéine, puisque la transfection de l'ADN muté permet de faire un sauvetage du phénotype observé par la répression de *Myo9b*. Si cet acide aminé avait joué un rôle dans la stabilité de la protéine, le changement de la méthionine pour la valine aurait déstabilisé la protéine qui n'aurait pu remplir son rôle ou qui aurait été rapidement dégradée, l'empêchant

encore une fois de remplir son rôle. Ainsi, les cellules auraient eu un phénotype semblable à celui des cellules *Myo9b^{kd}*.

La mutation induite dans les cellules *Myo9b^{AV1560M}* n'a pas d'impact significatif sur les paramètres observés au stade embryonnaire. Cependant, ces résultats ne permettent pas de conclure que la mutation n'est pas pathogène. En effet, cette mutation pourrait avoir un impact sur la dynamique de la migration des INs. Ainsi, l'imagerie en temps réel permettrait de vérifier l'impact de la mutation sur la migration des INs, par exemple en quantifiant la vitesse de migration, la distance ou le parcours des INs modifiés. De plus, la mutation du patient pourrait ne pas avoir d'impact sur la migration des INs, mais avoir un impact sur le développement postnatal des INs. La co-transfection du shARN et de l'ADNc contenant la mutation du patient permettrait ainsi de vérifier et de quantifier les changements morphologiques des INs matures. Finalement, la mutation du patient pourrait avoir un rôle postnatal important pour la fonction des INs. Ainsi, il se peut que la méthionine soit importante pour une interaction spécifique avec une autre protéine. Ainsi, le changement de cet acide aminé perturberait cette interaction spécifique causant un défaut dans la morphologie ou dans le rôle des INs.

Limites

L'électroporation *ex vivo* embryonnaire a été une méthode ardue à mettre au point, ayant nécessité près d'un an de travail, ce qui a limité l'avancement de mes expériences. Cependant, une fois en place, cette méthode permet de vérifier rapidement l'implication de gènes dans le développement embryonnaire et sera utile pour la validation d'autres gènes identifiés ultérieurement par le laboratoire de la Dre E. Rossignol.

La culture organotypique permet de garder un environnement moins perturbé que les cellules en culture, puisqu'elle permet de garder la structure cérébrale avec tous les types de cellules et de morphogènes présents à ce stade de développement. Cependant, l'électroporation *ex vivo*, ainsi que la mise en culture des tranches ne sont possibles qu'à la suite de nombreuses manipulations. Ainsi, il se peut que ces manipulations à elles seules perturbent le développement embryonnaire de l'encéphale. Une confirmation du phénotype *in vivo* devrait toujours être requise pour soutenir les hypothèses. À cet effet, nous avons établi une

collaboration avec le Dr M. Bähler (U. Muenster) afin d'obtenir une lignée de souris porteuses d'une délétion conditionnelle du gène *Myo9b* (souris *Myo9b^{flox/flox}*). Afin de vérifier si l'altération morphologique des INs en migration observée *in utero* a aussi lieu *in vivo*, nous effectuerons une délétion conditionnelle de *Myo9b* dans les INs en générant des souris *Dlx5/6^{cre};Myo9b^{flox/flox}*. Ces souris seront investiguées ultérieurement afin d'évaluer la morphologie de INs en migration, la vitesse et la distance parcourue par ces INs, ainsi que la distribution finale des INs corticaux chez les mutants en période postnatale. De plus, nous pourrons alors évaluer l'impact de la perte ciblée de *Myo9b* dans les INs sur le fonctionnement cérébral, par exemple en évaluant le seuil convulsif et les capacités cognitives des souris mutantes comparées à leurs fratries sauvages.

Ce mémoire décrit bien le phénotype obtenu suite à la répression de l'expression de *Myo9b* dans les INs. Ce phénotype est marqué. Cependant, l'impact de ces changements sur la dynamique de la migration des INs devra être exploré ultérieurement, par exemple par le biais de l'imagerie en temps réel. De plus, aucune étude fonctionnelle n'a été réalisée afin d'explorer les mécanismes sous-jacents par lesquels la répression de *Myo9b* entraîne ces changements morphologiques. Des études fonctionnelles seront entreprises ultérieurement afin d'explorer les hypothèses émises dans la section discussion de ce mémoire, en particulier sur l'impact de la répression de *Myo9b* sur l'activité de RhoA.

Finalement, j'ai dû limiter mes expériences à l'étude des rôles embryonnaires de *Myo9b* dans les INs. Cependant, compte tenu du rôle de *Myo9b* dans le développement dendritique des cellules pyramidales, il est possible de se demander si cette protéine joue aussi un rôle dans le développement dendritique des INs durant la phase postnatale. Ainsi, des cultures organotypiques postnatales pourraient être faites ultérieurement afin de vérifier l'implication de *Myo9b* dans le développement dendritique des INs en période postnatale.

Perspectives

MYO9b est une protéine dont les fonctions sont encore peu connues. Son rôle dans les cellules immunitaires, ainsi que les cascades signalétiques induites par son activation, sont de mieux en mieux décrits. Cependant, son rôle dans le développement neuronal demeure peu exploré et est

limité au développement dendritique des cellules pyramidales. Cette étude a permis de caractériser la localisation neuronale de MYO9b en période embryonnaire et postnatale et a pu démontrer son rôle dans la migration des INs corticaux pour la première fois. Cette étude élargit notre compréhension des mécanismes de la migration tangentielle des INs corticaux et du processus de polarisation cellulaire des INs en migration, ainsi que des conséquences d'une mauvaise polarisation. De plus, MYO9b a été mise en évidence par une étude d'exome chez des patients atteints d'encéphalopathies épileptogènes ne présentant aucune malformation corticale (3). Si la mutation dans cette protéine est à l'origine de ces encéphalopathies, les recherches sur l'implication de celle-ci dans le développement de l'encéphale sont importantes. Ainsi, une meilleure compréhension de la genèse de cette maladie pourrait permettre un meilleur suivi thérapeutique pour ces enfants, soit en ciblant la voie signalétique déficiente par cette mutation ou, dans un futur rapproché, en ciblant directement cette mutation par une thérapie génique personnalisée. De plus, avec de meilleures connaissances sur ce gène, il sera possible d'offrir aux parents de ces enfants un conseil génétique adapté durant lequel des informations plus précises pourront être communiquées.

Finalement, plusieurs expériences restent à faire afin de valider l'implication de *Myo9b* dans la migration (imagerie en temps réel) et le développement dendritique des INs corticaux. Des tests fonctionnels pourront être faits pour déterminer la voie touchée par la diminution de l'expression de *Myo9b*, tout d'abord, par des immunohistochimies, afin de vérifier la localisation de certaines protéines comme RhoA-GTP, puis par des études de co-immunoprécipitation, pour déterminer les protéines interagissant avec *Myo9b*. Aussi, des études *in vivo* permettront de caractériser l'impact de l'ablation sélective de *Myo9b* dans les INs *in vivo* chez des souris *Dlx5/6^{cre};Myo9b^{flox/flox}*, afin d'en évaluer les conséquences en terme d'épilepsie et de troubles cognitifs. Ainsi, des EEG pourront être effectués chez ces souris pour vérifier la présence d'épilepsie. De plus, il sera possible de faire des tests comportementaux chez ces souris afin de déterminer l'impact cognitif de la perte de *Myo9b* dans les INs. Toutes ces expériences permettront d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes de migration des INs corticaux.

Conclusion

La migration tangentielle des INs est un processus complexe qui implique un grand nombre de protéines. Ce processus complexe peut être perturbé à plusieurs niveaux et, ainsi, engendrer des défauts de migration de gravité variable. Les perturbations significatives de la migration des INs pourraient causer des maladies graves sans traitement efficace à ce jour pour corriger ou compenser les défauts de migration. Plusieurs mutations dans des gènes codant pour des protéines potentiellement impliquées dans la migration des INs ont été identifiées chez des patients souffrant d'encéphalopathie épileptogène (3). L'étude présentée dans ce mémoire a permis d'identifier pour la première fois le rôle de *Myo9b* dans la migration des INs. Ainsi, la diminution de l'expression de ce gène mène à une perte de polarisation des INs, menant à des neurites rostraux plus longs et plus branchés et à un nombre plus élevé de neurites caudaux plus long et plus branchés. Ce défaut morphologique majeur pourrait perturber la migration des INs, causant à plus long terme, des défauts d'inhibition corticaux entraînant une épilepsie. La mutation du gène *MYO9b* trouvée chez un patient atteint d'encéphalopathie épileptogène ne cause pas de défaut morphologique majeur chez les INs en migration. Cependant, cette mutation pourrait avoir un impact au niveau de la dynamique de la migration des INs ou au niveau morphologique des INs post-nataux. Nos résultats démontrent l'importance de cette protéine dans la morphogenèse des INs corticaux et dans leur migration. En favorisant une meilleure compréhension du rôle de *Myo9b* dans le développement des INs, notre étude permet d'offrir un meilleur diagnostic aux patients et éventuellement de développer des thérapies plus efficaces pour ceux-ci.

Références

1. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. 2010;51(4):676-85.
2. Nieh SE, Sherr EH. Epileptic encephalopathies: new genes and new pathways. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2014;11(4):796-806.
3. Michaud JL, Lachance M, Hamdan FF, Carmant L, Lortie A, Diadori P, et al. The genetic landscape of infantile spasms. *Human molecular genetics*. 2014;23(18):4846-58.
4. Mefford HC, Muhle H, Ostertag P, von Spiczak S, Buysse K, Baker C, et al. Genome-wide copy number variation in epilepsy: novel susceptibility loci in idiopathic generalized and focal epilepsies. *PLoS Genet*. 2010;6(5):e1000962.
5. Mullen SA, Carvill GL, Bellows S, Bayly MA, Berkovic SF, Dibbens LM, et al. Copy number variants are frequent in genetic generalized epilepsy with intellectual disability. *Neurology*. 2013;81(17):1507-14.
6. Balius TE, Allen WJ, Mukherjee S, Rizzo RC. Grid-based molecular footprint comparison method for docking and de novo design: application to HIVgp41. *Journal of computational chemistry*. 2013;34(14):1226-40.
7. Barcia G, Fleming MR, Deligniere A, Gazula VR, Brown MR, Langouet M, et al. De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy. *Nat Genet*. 2012;44(11):1255-9.
8. Rossignol E. Genetics and function of neocortical GABAergic interneurons in neurodevelopmental disorders. *Neural plasticity*. 2011;2011:649325.
9. Rossignol E, Kruglikov I, van den Maagdenberg AM, Rudy B, Fishell G. Ca 2.1 ablation in cortical interneurons selectively impairs fast-spiking basket cells and causes generalized seizures. *Ann Neurol*. 2013.
10. Bear MF, Connors, B. W., Paradisio, M. A. *Neurosciences, à la découverte du cerveau*. 3e édition ed. France2010. 881 p.
11. Corallo D, Trapani V, Bonaldo P. The notochord: structure and functions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2015;72(16):2989-3008.
12. Copp AJ, Greene ND. Neural tube defects--disorders of neurulation and related embryonic processes. *Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology*. 2013;2(2):213-27.
13. Tang K, Peng G, Qiao Y, Song L, Jing N. Intrinsic regulations in neural fate commitment. *Development, growth & differentiation*. 2015;57(2):109-20.
14. Mayanil CS. Transcriptional and epigenetic regulation of neural crest induction during neurulation. *Developmental neuroscience*. 2013;35(5):361-72.
15. Sokol SY. Spatial and temporal aspects of Wnt signaling and planar cell polarity during vertebrate embryonic development. *Seminars in cell & developmental biology*. 2015;42:78-85.
16. Shyamala K, Yanduri S, Girish HC, Murgod S. Neural crest: The fourth germ layer. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*. 2015;19(2):221-9.
17. Marin O. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons. *Eur J Neurosci*. 2013;38(1):2019-29.

18. Li G, Adesnik H, Li J, Long J, Nicoll RA, Rubenstein JL, et al. Regional distribution of cortical interneurons and development of inhibitory tone are regulated by Cxcl12/Cxcr4 signaling. *J Neurosci*. 2008;28(5):1085-98.
19. Petilla Interneuron Nomenclature G, Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, et al. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nature reviews Neuroscience*. 2008;9(7):557-68.
20. Klausberger T, Somogyi P. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science*. 2008;321(5885):53-7.
21. Somogyi P, Klausberger T. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol*. 2005;562(Pt 1):9-26.
22. DeFelipe J. Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cerebral cortex*. 1993;3(4):273-89.
23. Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Developmental neurobiology*. 2011;71(1):45-61.
24. Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL. Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science*. 1997;278(5337):474-6.
25. Pleasure SJ, Anderson S, Hevner R, Bagri A, Marin O, Lowenstein DH, et al. Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons. *Neuron*. 2000;28(3):727-40.
26. Kohwi M, Petryniak MA, Long JE, Ekker M, Obata K, Yanagawa Y, et al. A subpopulation of olfactory bulb GABAergic interneurons is derived from Emx1- and Dlx5/6-expressing progenitors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(26):6878-91.
27. Porteus MH, Bulfone A, Liu JK, Puellas L, Lo LC, Rubenstein JL. DLX-2, MASH-1, and MAP-2 expression and bromodeoxyuridine incorporation define molecularly distinct cell populations in the embryonic mouse forebrain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1994;14(11 Pt 1):6370-83.
28. Eisenstat DD, Liu JK, Mione M, Zhong W, Yu G, Anderson SA, et al. DLX-1, DLX-2, and DLX-5 expression define distinct stages of basal forebrain differentiation. *The Journal of comparative neurology*. 1999;414(2):217-37.
29. Anderson SA, Qiu M, Bulfone A, Eisenstat DD, Meneses J, Pedersen R, et al. Mutations of the homeobox genes Dlx-1 and Dlx-2 disrupt the striatal subventricular zone and differentiation of late born striatal neurons. *Neuron*. 1997;19(1):27-37.
30. Bulfone A, Wang F, Hevner R, Anderson S, Cutforth T, Chen S, et al. An olfactory sensory map develops in the absence of normal projection neurons or GABAergic interneurons. *Neuron*. 1998;21(6):1273-82.
31. Gonchar Y, Burkhalter A. Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cereb Cortex*. 1997;7(4):347-58.
32. Butt SJ, Sousa VH, Fuccillo MV, Hjerling-Leffler J, Miyoshi G, Kimura S, et al. The requirement of Nkx2-1 in the temporal specification of cortical interneuron subtypes. *Neuron*. 2008;59(5):722-32.
33. Du T, Xu Q, Ocbina PJ, Anderson SA. NKX2.1 specifies cortical interneuron fate by activating Lhx6. *Development*. 2008;135(8):1559-67.
34. Zhao Y, Flandin P, Long JE, Cuesta MD, Westphal H, Rubenstein JL. Distinct molecular pathways for development of telencephalic interneuron subtypes revealed through analysis of Lhx6 mutants. *The Journal of comparative neurology*. 2008;510(1):79-99.

35. Liodis P, Denaxa M, Grigoriou M, Akufo-Addo C, Yanagawa Y, Pachnis V. Lhx6 activity is required for the normal migration and specification of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci*. 2007;27(12):3078-89.
36. Zhao Y, Flandin P, Vogt D, Blood A, Hermes E, Westphal H, et al. Ldb1 is essential for development of Nkx2.1 lineage derived GABAergic and cholinergic neurons in the telencephalon. *Developmental biology*. 2014;385(1):94-106.
37. Batista-Brito R, Rossignol E, Hjerling-Leffler J, Denaxa M, Wegner M, Lefebvre V, et al. The cell-intrinsic requirement of Sox6 for cortical interneuron development. *Neuron*. 2009;63(4):466-81.
38. Xu Q, Tam M, Anderson SA. Fate mapping Nkx2.1-lineage cells in the mouse telencephalon. *J Comp Neurol*. 2008;506(1):16-29.
39. Chow A, Erisir A, Farb C, Nadal MS, Ozaita A, Lau D, et al. K(+) channel expression distinguishes subpopulations of parvalbumin- and somatostatin-containing neocortical interneurons. *J Neurosci*. 1999;19(21):9332-45.
40. Goldberg EM, Clark BD, Zaghera E, Nahmani M, Erisir A, Rudy B. K+ channels at the axon initial segment dampen near-threshold excitability of neocortical fast-spiking GABAergic interneurons. *Neuron*. 2008;58(3):387-400.
41. Zaitsev AV, Povysheva NV, Lewis DA, Krimer LS. P/Q-type, but not N-type, calcium channels mediate GABA release from fast-spiking interneurons to pyramidal cells in rat prefrontal cortex. *J Neurophysiol*. 2007;97(5):3567-73.
42. Pinto DJ, Brumberg JC, Simons DJ. Circuit dynamics and coding strategies in rodent somatosensory cortex. *J Neurophysiol*. 2000;83(3):1158-66.
43. Miller LM, Escabi MA, Schreiner CE. Feature selectivity and interneuronal cooperation in the thalamocortical system. *J Neurosci*. 2001;21(20):8136-44.
44. Gabernet L, Jadhav SP, Feldman DE, Carandini M, Scanziani M. Somatosensory integration controlled by dynamic thalamocortical feed-forward inhibition. *Neuron*. 2005;48(2):315-27.
45. Szabadics J, Varga C, Molnar G, Olah S, Barzo P, Tamas G. Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science*. 2006;311(5758):233-5.
46. Woodruff AR, McGarry LM, Vogels TP, Inan M, Anderson SA, Yuste R. State-dependent function of neocortical chandelier cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(49):17872-86.
47. Glickfeld LL, Roberts JD, Somogyi P, Scanziani M. Interneurons hyperpolarize pyramidal cells along their entire somatodendritic axis. *Nat Neurosci*. 2009;12(1):21-3.
48. Woodruff A, Xu Q, Anderson SA, Yuste R. Depolarizing effect of neocortical chandelier neurons. *Front Neural Circuits*. 2009;3:15.
49. Inan M, Anderson SA. The chandelier cell, form and function. *Current opinion in neurobiology*. 2014;26:142-8.
50. Kawaguchi Y, Kubota Y. Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. *J Neurosci*. 1996;16(8):2701-15.
51. Wang Y, Toledo-Rodriguez M, Gupta A, Wu C, Silberberg G, Luo J, et al. Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *J Physiol*. 2004;561(Pt 1):65-90.
52. Ma Y, Hu H, Berrebi AS, Mathers PH, Agmon A. Distinct subtypes of somatostatin-containing neocortical interneurons revealed in transgenic mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(19):5069-82.

53. Lee S, Hjerling-Leffler J, Zagha E, Fishell G, Rudy B. The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30(50):16796-808.
54. Kelsom C, Lu W. Development and specification of GABAergic cortical interneurons. *Cell & bioscience*. 2013;3(1):19.
55. Perrenoud Q, Rossier J, Geoffroy H, Vitalis T, Gallopin T. Diversity of GABAergic interneurons in layer VIa and VIb of mouse barrel cortex. *Cerebral cortex*. 2013;23(2):423-41.
56. Pfeiffer CK. Inhibitory neurons: vip cells hit the brake on inhibition. *Curr Biol*. 2014;24(1):R18-20.
57. Lee S, Kruglikov I, Huang ZJ, Fishell G, Rudy B. A disinhibitory circuit mediates motor integration in the somatosensory cortex. *Nat Neurosci*. 2013;16(11):1662-70.
58. Pi HJ, Hangya B, Kvitsiani D, Sanders JI, Huang ZJ, Kepecs A. Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control. *Nature*. 2013;503(7477):521-4.
59. Overstreet-Wadiche L, McBain CJ. Neurogliaform cells in cortical circuits. *Nature reviews Neuroscience*. 2015;16(8):458-68.
60. Lodato S, Tomassy GS, De Leonibus E, Uzcategui YG, Andolfi G, Armentano M, et al. Loss of COUP-TFI alters the balance between caudal ganglionic eminence- and medial ganglionic eminence-derived cortical interneurons and results in resistance to epilepsy. *J Neurosci*. 2011;31(12):4650-62.
61. Miyoshi G, Young A, Petros T, Karayannis T, McKenzie Chang M, Lavado A, et al. Prox1 Regulates the Subtype-Specific Development of Caudal Ganglionic Eminence-Derived GABAergic Cortical Interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2015;35(37):12869-89.
62. Marin O, Valiente M, Ge X, Tsai LH. Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(2):a001834.
63. de Anda FC, Tsai LH. Axon selection: From a polarized cytoplasm to a migrating neuron. *Communicative & integrative biology*. 2011;4(3):304-7.
64. Manes S, Gomez-Mouton C, Lacalle RA, Jimenez-Baranda S, Mira E, Martinez AC. Mastering time and space: immune cell polarization and chemotaxis. *Semin Immunol*. 2005;17(1):77-86.
65. Chung CY, Funamoto S, Firtel RA. Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. *Trends Biochem Sci*. 2001;26(9):557-66.
66. Borrell V, Cardenas A, Ciceri G, Galceran J, Flames N, Pla R, et al. Slit/Robo signaling modulates the proliferation of central nervous system progenitors. *Neuron*. 2012;76(2):338-52.
67. Zimmer G, Garcez P, Rudolph J, Niehage R, Weth F, Lent R, et al. Ephrin-A5 acts as a repulsive cue for migrating cortical interneurons. *Eur J Neurosci*. 2008;28(1):62-73.
68. Bissonette GB, Bae MH, Suresh T, Jaffe DE, Powell EM. Prefrontal cognitive deficits in mice with altered cerebral cortical GABAergic interneurons. *Behavioural brain research*. 2014;259:143-51.
69. Powell EM, Mars WM, Levitt P. Hepatocyte growth factor/scatter factor is a motogen for interneurons migrating from the ventral to dorsal telencephalon. *Neuron*. 2001;30(1):79-89.
70. Paratcha G, Ibanez CF, Ledda F. GDNF is a chemoattractant factor for neuronal precursor cells in the rostral migratory stream. *Molecular and cellular neurosciences*. 2006;31(3):505-14.
71. Perrinjaquet M, Sjostrand D, Moliner A, Zechel S, Lamballe F, Maina F, et al. MET signaling in GABAergic neuronal precursors of the medial ganglionic eminence restricts GDNF activity in cells that express GFRalpha1 and a new transmembrane receptor partner. *Journal of cell science*. 2011;124(Pt 16):2797-805.
72. Canty AJ, Dietze J, Harvey M, Enomoto H, Milbrandt J, Ibanez CF. Regionalized loss of parvalbumin interneurons in the cerebral cortex of mice with deficits in GFRalpha1 signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(34):10695-705.

73. Sanchez-Huertas C, Rico B. CREB-Dependent Regulation of GAD65 Transcription by BDNF/TrkB in Cortical Interneurons. *Cerebral cortex*. 2011;21(4):777-88.
74. Fiumelli H, Kiraly M, Ambrus A, Magistretti PJ, Martin JL. Opposite regulation of calbindin and calretinin expression by brain-derived neurotrophic factor in cortical neurons. *Journal of neurochemistry*. 2000;74(5):1870-7.
75. Alcantara S, Pozas E, Ibanez CF, Soriano E. BDNF-modulated spatial organization of Cajal-Retzius and GABAergic neurons in the marginal zone plays a role in the development of cortical organization. *Cerebral cortex*. 2006;16(4):487-99.
76. Petridis AK, El Maarouf A. Brain-derived neurotrophic factor levels influence the balance of migration and differentiation of subventricular zone cells, but not guidance to the olfactory bulb. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. 2011;18(2):265-70.
77. Chiaramello S, Dalmaso G, Bezin L, Marcel D, Jourdan F, Peretto P, et al. BDNF/ TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways. *The European journal of neuroscience*. 2007;26(7):1780-90.
78. Bortone D, Polleux F. KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron*. 2009;62(1):53-71.
79. Inada H, Watanabe M, Uchida T, Ishibashi H, Wake H, Nemoto T, et al. GABA regulates the multidirectional tangential migration of GABAergic interneurons in living neonatal mice. *PloS one*. 2011;6(12):e27048.
80. Andrews WD, Zito A, Memi F, Jones G, Tamamaki N, Parnavelas JG. Limk2 mediates semaphorin signalling in cortical interneurons migrating through the subpallium. *Biology open*. 2013;2(3):277-82.
81. Zimmer G, Schanuel SM, Burger S, Weth F, Steinecke A, Bolz J, et al. Chondroitin sulfate acts in concert with semaphorin 3A to guide tangential migration of cortical interneurons in the ventral telencephalon. *Cereb Cortex*. 2010;20(10):2411-22.
82. Andrews W, Barber M, Hernandez-Miranda LR, Xian J, Rakic S, Sundaresan V, et al. The role of Slit-Robo signaling in the generation, migration and morphological differentiation of cortical interneurons. *Developmental biology*. 2008;313(2):648-58.
83. Hernandez-Miranda LR, Cariboni A, Faux C, Ruhrberg C, Cho JH, Cloutier JF, et al. Robo1 regulates semaphorin signaling to guide the migration of cortical interneurons through the ventral forebrain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(16):6174-87.
84. Flames N, Long JE, Garratt AN, Fischer TM, Gassmann M, Birchmeier C, et al. Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron*. 2004;44(2):251-61.
85. Martini FJ, Valiente M, Lopez Bendito G, Szabo G, Moya F, Valdeolmillos M, et al. Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. *Development*. 2009;136(1):41-50.
86. Lavdas AA, Grigoriou M, Pachnis V, Parnavelas JG. The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*. 1999;19(18):7881-8.
87. Tanaka D, Nakaya Y, Yanagawa Y, Obata K, Murakami F. Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins. *Development*. 2003;130(23):5803-13.
88. Tanaka DH, Maekawa K, Yanagawa Y, Obata K, Murakami F. Multidirectional and multizonal tangential migration of GABAergic interneurons in the developing cerebral cortex. *Development*. 2006;133(11):2167-76.

89. Wichterle H, Turnbull DH, Nery S, Fishell G, Alvarez-Buylla A. In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development*. 2001;128(19):3759-71.
90. Lysko DE, Putt M, Golden JA. SDF1 regulates leading process branching and speed of migrating interneurons. *J Neurosci*. 2011;31(5):1739-45.
91. Meechan DW, Tucker ES, Maynard TM, LaMantia AS. Cxcr4 regulation of interneuron migration is disrupted in 22q11.2 deletion syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(45):18601-6.
92. Tiveron MC, Rossel M, Moepps B, Zhang YL, Seidenfaden R, Favor J, et al. Molecular interaction between projection neuron precursors and invading interneurons via stromal-derived factor 1 (CXCL12)/CXCR4 signaling in the cortical subventricular zone/intermediate zone. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(51):13273-8.
93. Elias LA, Turmaine M, Parnavelas JG, Kriegstein AR. Connexin 43 mediates the tangential to radial migratory switch in ventrally derived cortical interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30(20):7072-7.
94. Hevner RF, Daza RA, Englund C, Kohtz J, Fink A. Postnatal shifts of interneuron position in the neocortex of normal and reeler mice: evidence for inward radial migration. *Neuroscience*. 2004;124(3):605-18.
95. Lodato S, Rouaux C, Quast KB, Jantrachotechatchawan C, Studer M, Hensch TK, et al. Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. *Neuron*. 2011;69(4):763-79.
96. Miyoshi G, Fishell G. GABAergic interneuron lineages selectively sort into specific cortical layers during early postnatal development. *Cerebral cortex*. 2011;21(4):845-52.
97. Uhlen P, Fritz N, Smedler E, Malmersjo S, Kanatani S. Calcium signaling in neocortical development. *Developmental neurobiology*. 2015;75(4):360-8.
98. Tsai LH, Gleeson JG. Nucleokinesis in neuronal migration. *Neuron*. 2005;46(3):383-8.
99. Bellion A, Baudoin JP, Alvarez C, Bornens M, Metin C. 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*. 2005;25(24):5691-9.
100. Peyre E, Silva CG, Nguyen L. Crosstalk between intracellular and extracellular signals regulating interneuron production, migration and integration into the cortex. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015;9:129.
101. Govak EE, Hatten ME, Van Aelst L. The role of Rho GTPase proteins in CNS neuronal migration. *Dev Neurobiol*. 2011;71(6):528-53.
102. Gallo G, Letourneau PC. Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues. *J Neurobiol*. 2004;58(1):92-102.
103. Kapitein LC, Hoogenraad CC. Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton. *Neuron*. 2015;87(3):492-506.
104. Chalmers DT, Behan DP. The use of constitutively active GPCRs in drug discovery and functional genomics. *Nature reviews Drug discovery*. 2002;1(8):599-608.
105. Audet M, Bouvier M. Restructuring G-protein- coupled receptor activation. *Cell*. 2012;151(1):14-23.
106. Laussu J, Khuong A, Gautrais J, Davy A. Beyond boundaries--Eph:ephrin signaling in neurogenesis. *Cell adhesion & migration*. 2014;8(4):349-59.
107. Steinecke A, Gampe C, Nitsche F, Bolz J. DISC1 knockdown impairs the tangential migration of cortical interneurons by affecting the actin cytoskeleton. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014;8:190.

108. Tanaka T, Serneo FF, Higgins C, Gambello MJ, Wynshaw-Boris A, Gleeson JG. Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *J Cell Biol.* 2004;165(5):709-21.
109. Koizumi H, Higginbotham H, Poon T, Tanaka T, Brinkman BC, Gleeson JG. Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain. *Nat Neurosci.* 2006;9(6):779-86.
110. Higginbotham HR, Gleeson JG. The centrosome in neuronal development. *Trends Neurosci.* 2007;30(6):276-83.
111. McManus MF, Nasrallah IM, Pancoast MM, Wynshaw-Boris A, Golden JA. Lis1 is necessary for normal non-radial migration of inhibitory interneurons. *The American journal of pathology.* 2004;165(3):775-84.
112. Baudoin JP, Alvarez C, Gaspar P, Metin C. Nocodazole-induced changes in microtubule dynamics impair the morphology and directionality of migrating medial ganglionic eminence cells. *Developmental neuroscience.* 2008;30(1-3):132-43.
113. Tivodar S, Kalemaki K, Kounoupa Z, Vidaki M, Theodorakis K, Denaxa M, et al. Rac-GTPases Regulate Microtubule Stability and Axon Growth of Cortical GABAergic Interneurons. *Cerebral cortex.* 2015;25(9):2370-82.
114. Godin JD, Thomas N, Laguesse S, Malinouskaya L, Close P, Malaise O, et al. p27(Kip1) is a microtubule-associated protein that promotes microtubule polymerization during neuron migration. *Developmental cell.* 2012;23(4):729-44.
115. Cobos I, Calcagnotto ME, Vilaythong AJ, Thwin MT, Noebels JL, Baraban SC, et al. Mice lacking Dlx1 show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. *Nature neuroscience.* 2005;8(8):1059-68.
116. Potter GB, Petryniak MA, Shevchenko E, McKinsey GL, Ekker M, Rubenstein JL. Generation of Cre-transgenic mice using Dlx1/Dlx2 enhancers and their characterization in GABAergic interneurons. *Molecular and cellular neurosciences.* 2009;40(2):167-86.
117. Howard MA, Rubenstein JL, Baraban SC. Bidirectional homeostatic plasticity induced by interneuron cell death and transplantation in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2014;111(1):492-7.
118. Penagarikano O, Abrahams BS, Herman EI, Winden KD, Gdalyahu A, Dong H, et al. Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal migration abnormalities, and core autism-related deficits. *Cell.* 2011;147(1):235-46.
119. Ben-Ari Y. Is birth a critical period in the pathogenesis of autism spectrum disorders? *Nature reviews Neuroscience.* 2015;16(8):498-505.
120. Price MG, Yoo JW, Burgess DL, Deng F, Hrachovy RA, Frost JD, Jr., et al. A triplet repeat expansion genetic mouse model of infantile spasms syndrome, Arx(GCG)¹⁰⁺⁷, with interneuronopathy, spasms in infancy, persistent seizures, and adult cognitive and behavioral impairment. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2009;29(27):8752-63.
121. Friocourt G, Parnavelas JG. Identification of Arx targets unveils new candidates for controlling cortical interneuron migration and differentiation. *Frontiers in cellular neuroscience.* 2011;5:28.
122. Colasante G, Collombat P, Raimondi V, Bonanomi D, Ferrai C, Maira M, et al. Arx is a direct target of Dlx2 and thereby contributes to the tangential migration of GABAergic interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2008;28(42):10674-86.
123. Olivetti PR, Maheshwari A, Noebels JL. Neonatal estradiol stimulation prevents epilepsy in Arx model of X-linked infantile spasms syndrome. *Science translational medicine.* 2014;6(220):220ra12.

124. Dhavan R, Tsai LH. A decade of CDK5. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2001;2(10):749-59.
125. Rakic S, Kanatani S, Hunt D, Faux C, Cariboni A, Chiara F, et al. Cdk5 phosphorylation of ErbB4 is required for tangential migration of cortical interneurons. *Cerebral cortex*. 2015;25(4):991-1003.
126. Jacob J. Cortical interneuron dysfunction in epilepsy associated with autism spectrum disorders. *Epilepsia*. 2015.
127. Hunt RF, Baraban SC. Interneuron Transplantation as a Treatment for Epilepsy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015;5(12).
128. Long H, Zhu X, Yang P, Gao Q, Chen Y, Ma L. Myo9b and RICS modulate dendritic morphology of cortical neurons. *Cerebral cortex*. 2013;23(1):71-9.
129. Bahler M, Elfrink K, Hanley PJ, Thelen S, Xu Y. Cellular functions of class IX myosins in epithelia and immune cells. *Biochemical Society transactions*. 2011;39(5):1166-8.
130. Wirth JA, Jensen KA, Post PL, Bement WM, Mooseker MS. Human myosin-IXb, an unconventional myosin with a chimerin-like rho/rac GTPase-activating protein domain in its tail. *Journal of cell science*. 1996;109 (Pt 3):653-61.
131. Reinhard J, Scheel AA, Diekmann D, Hall A, Ruppert C, Bahler M. A novel type of myosin implicated in signalling by rho family GTPases. *The EMBO journal*. 1995;14(4):697-704.
132. Hanley PJ, Xu Y, Kronlage M, Grobe K, Schon P, Song J, et al. Motorized RhoGAP myosin IXb (Myo9b) controls cell shape and motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(27):12145-50.
133. Kong R, Yi F, Wen P, Liu J, Chen X, Ren J, et al. Myo9b is a key player in SLIT/ROBO-mediated lung tumor suppression. *The Journal of clinical investigation*. 2015;2015.
134. Xu Y, Pektor S, Balkow S, Hemkemeyer SA, Liu Z, Grobe K, et al. Dendritic cell motility and T cell activation requires regulation of Rho-cofilin signaling by the Rho-GTPase activating protein myosin IXb. *Journal of immunology*. 2014;192(8):3559-68.
135. Makowska KA, Hughes RE, White KJ, Wells CM, Peckham M. Specific Myosins Control Actin Organization, Cell Morphology, and Migration in Prostate Cancer Cells. *Cell reports*. 2015;13(10):2118-25.
136. Konigs V, Jennings R, Vogl T, Horsthemke M, Bachg AC, Xu Y, et al. Mouse macrophages completely lacking Rho subfamily GTPases (RhoA, RhoB, and RhoC) have severe lamellipodial retraction defects, but robust chemotactic navigation and altered motility. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(44):30772-84.
137. Liu Z, Xu Y, Zhang X, Song J, Sorokin L, Bahler M. The motorized RhoGAP myosin IXb (Myo9b) in leukocytes regulates experimental autoimmune encephalomyelitis induction and recovery. *Journal of neuroimmunology*. 2015;282:25-32.
138. Azzarelli R, Kerloch T, Pacary E. Regulation of cerebral cortex development by Rho GTPases: insights from in vivo studies. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014;8:445.
139. Tang J, Ip JP, Ye T, Ng YP, Yung WH, Wu Z, et al. Cdk5-dependent Mst3 phosphorylation and activity regulate neuronal migration through RhoA inhibition. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2014;34(22):7425-36.
140. Zhao PP, Yao MJ, Chang SY, Gou LT, Liu MF, Qiu ZL, et al. Novel function of PIWIL1 in neuronal polarization and migration via regulation of microtubule-associated proteins. *Molecular brain*. 2015;8:39.