



HAL
open science

Etude du rôle de protéines apparentées aux cadhérines dans le développement des interneurons du cortex auditif

Baptiste Libé-Philippot

► **To cite this version:**

Baptiste Libé-Philippot. Etude du rôle de protéines apparentées aux cadhérines dans le développement des interneurons du cortex auditif. Biologie du développement. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066112 . tel-01666045

HAL Id: tel-01666045

<https://theses.hal.science/tel-01666045>

Submitted on 18 Dec 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale « Complexité du vivant »

Unité de Génétique et Physiologie de l'Audition (Institut Pasteur)

Etude du rôle de protéines apparentées aux cadhérines dans le développement des interneurons du cortex auditif

Le développement des interneurons du cortex auditif met en jeu les protéines apparentées aux cadhérines qui sont essentielles à la transduction mécano-électrique des cellules sensorielles auditives

Par Baptiste Libé-Philippot

Thèse de doctorat de neurobiologie et biologie du développement

Dirigée par Christine Petit

Présentée et soutenue publiquement le 16 juin 2017 devant un jury composé de :

Gaspar, Patricia Directrice de recherche à l'INSERM (Institut du Fer à Moulin, Paris)	présidente
Jabaudon, Denis Professeur à l'Université de Genève (Suisse)	rapporteur
Crépel, Valérie Directrice de recherche à l'INSERM (Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, Marseille)	rapporteur
Mège, René-Marc Directeur de recherche au CNRS (Institut Jacques Monod, Paris)	examineur
Renier, Nicolas Chef d'équipe à l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (Paris)	examineur
Petit, Christine Professeur au Collège de France (Institut Pasteur, Paris)	directrice de thèse

A Nathalie,

Remerciements

Je remercie **Christine Petit** de m'avoir accueilli dans son unité et d'avoir dirigé ma thèse de doctorat, **Nicolas Michalski** d'avoir été mon co-encadrant. Je les remercie d'avoir rendu possible la publication de nos résultats ainsi que pour leur relecture de ce manuscrit de thèse.

Je remercie les membres du jury et du comité de thèse d'avoir accepté d'évaluer et de suivre mon travail de thèse : **Michel Cohen-Tannoudji** (Institut Pasteur), **Valérie Crépel** (Institut de Neurobiologie de la Méditerranée), **Marta Garcia** (Institut du Fer à Moulin), **Patricia Gaspar** (Institut du Fer à moulin), **Denis Jabaudon** (Université de Genève, Suisse), **Clément Léna** (Ecole normale supérieure), **René-Marc Mège** (Institut Jacques Monod) et **Nicolas Renier** (Institut du Cerveau et de la Moelle épinière).

J'adresse toute ma gratitude à **Christine Métin** (Institut du Fer à Moulin), pour l'aide précieuse qu'elle a apportée à la réalisation de ce projet, sa disponibilité et nos riches échanges sur les interneurons et la biologie, ainsi qu'à **Paul Avan** (Université d'Auvergne) pour les moments passés ensemble à mesurer les seuils auditifs de nos souris. Je tiens à exprimer ma reconnaissance à **Jean-Pierre Hardelin** pour ses relectures critiques du manuscrit de l'article et d'une partie de celui de thèse (ainsi que les transports à vélos de biopsies depuis l'Institut du Fer à Moulin !). Je remercie mon tuteur à l'Ecole normale supérieure, **Michel Volovitch**, pour ses conseils avant la thèse et pour son soutien à l'obtention de l'allocation spécifique.

Je remercie chaleureusement **Typhaine Dupont**, **Sébastien Le Gal** et **Céline Trébeau** pour l'entretien des lignées de souris, **Typhaine** pour son aide apportée dans les premières expériences d'enregistrements extracellulaires *in vivo*, **Sébastien** pour des cryosections et des immuno-marquages, **Céline** et **Typhaine** pour les « missions » à l'animalerie Lwoff (!), **Vincent Michel** qui a pris de magnifiques images représentatives au microscope confocal et **Jacques Boutet de Monvel** pour son aide apportée lors de l'analyse d'image et la mise en place des stimulations sonores. Je remercie **Victor Bénichoux** et **Amel El-Bahloul** qui ont relu des parties de ce manuscrit de thèse.

Je remercie les personnes qui ont généreusement accepté de discuter de ce travail à différentes étapes de sa maturation, et qui ont donc influencé sa mise en œuvre : **Silvia Arber** (Université de Bâle, Suisse), **Batiste Boeda** (Institut Pasteur), **Mario de Bono** (Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Royaume-Uni) qui m'a appris qu'il faut d'abord identifier la *key question* d'un travail de recherche, **Sandrine Etienne-Manneville** (Institut Pasteur), **Sonia Garel** (Ecole normale supérieure), **Israel Nelken** (The Hebrew University of Jerusalem, Israël), **Dan Sanes** (Université de New York, Etats-Unis). Je remercie **Gabriel Lepousez** (Institut Pasteur) pour sa relecture du manuscrit de l'article et ses conseils en électrophysiologie extracellulaire *in vivo*.

Je salue mes camarades doctorants dans le laboratoire : **Sophie Boucher**, **Charlotte Calvet**, **Matteo Cortese**, **Ménélik Labbé**, **Pranav Patni** ; je remercie plus particulièrement **Alice Emptoz** de m'avoir montré ses injections de vecteurs lentiviraux ainsi qu'**Elise Pepermans** de m'avoir rapporté l'excitabilité accrue de ses souris hétérozygotes mutantes pour *protocadhérine-15* et *cadhérine-23*. Je salue des camarades doctorants de l'Institut Pasteur : **Marie Denizet**, **Allain-Thibeault Ferhat**, **Ophélie Foubet**, **Lauriane Harrington** et **Olivier Schiettekatte**.

Je salue **Ambre Le Guirriec**, stagiaire l'été 2014, avec qui j'ai réalisé mes premiers enregistrements extracellulaires *in vivo* et avec qui j'ai commencé à étudier le développement embryonnaire du cortex auditif, ainsi que **Mathilde Gagliardini**, stagiaire au premier semestre 2017 qui continuera l'étude du rôle des gènes dits de surdité périphérique dans le système nerveux central (je lui souhaite bon courage !).

Je tiens à remercier les autres membres du laboratoire pour leur générosité, leurs aides ponctuelles, leurs conseils et nos échanges : **Chantal Archambeau, Estelle Atse, Yosra Bouyacoub, Danica Ciric, Jean Defourny, Sedigheh Delmaghani, Aziz El-Amraoui, Marie Renée Gillard, Boris Gourévitch, Ghizlene Lahlou, Gaele Lefèvre, Jacqueline Levilliers, Andréa Lelli, Célia Loriette, Birame Mane, Alexandre Parrin, Isabelle Perfettini, Michèle Roa, Saaid Safieddine, Marie Strigalev, Fabienne Wong Jun Tai, Mei Xin** ; et plus particulièrement, **Michèle Barillot** pour son travail de secrétariat, **Montserrat Bosch Grau** pour son enthousiasme et ses conseils, **Sébastien Chardenoux** et **Sylvie Nouaille** pour leur bonne humeur et le génotypages de quelques portées, **Raphaël Etournay** pour ses conseils concernant l'après thèse, **Danuta Oficjalska** pour son important investissement administratif et son intérêt pour les expériences menées et **Elisabeth Verpy** pour son soutien et ses conseils quant aux immuno-marquages pour la stéréociline et l'otogeline. Je remercie de même à l'Institut du Fer à Moulin **Valentina Grampa, Claire Leclech** et **Maria Pedraza Boti** pour leur aide apportée aux expériences de culture *in vitro*.

Je remercie chaleureusement dans le département de neurosciences **Elodie Ey** pour avoir partagé avec nous sa pièce à l'animalerie Metchnikoff et salue **Julie Cateau** avec qui j'ai réalisé une expérience comparative de l'anesthésie de souriceaux. Je remercie **l'animalerie centrale, le service vétérinaire** de l'Institut Pasteur, **le personnel des animaleries Monod, Metchnikoff et Lwoff**, et **la plateforme d'imagerie** de l'Institut Pasteur, sans qui nous n'aurions pas pu travailler dans d'aussi bonnes conditions. Je salue **Elise Caliot** aux Ressources humaines pour son écoute et son aide à la construction d'un projet professionnel.

Je remercie **Colette Dehay** (Institut Cellules souches et Cerveau), **Makoto Sato** (University of Fukui, Japon), **Nicoletta Kessarlis** (University College London, Royaume-Uni) et **Anna-Katerina Hadjantonakis** (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, Etats-Unis) que je n'ai jamais vus mais qui nous ont généreusement donné, respectivement, des tranches d'embryons de macaque et les lignées de souris $Adgrv1^{tm1Msat}$ et $Adgrv1^{YFP}$, $Nkx2-1-cre$ et RFP^+ .

La thèse n'aurait pas été aussi agréable sans les moments passés au Palais de la découverte, en particulier la formation à la médiation et le contact avec le public, la rédaction d'articles de vulgarisation dans *Découverte* et les Semaines du cerveau 2015-2017. Je tiens pour cela à remercier **Jean-Philippe Bricka, Marie Canard, Gaëlle Courty, Elodie Ducasse, Stéphanie Kapler, Philippe Lavaivre, Yann Lefranc, Noémie Lozac'h-Vilain, Aurélie Massaux** et **Tanguy Schindler**.

Je ne remercierai jamais assez ma famille, ma belle-famille et mes amis pour leur soutien et tout ce qu'ils ont pu m'apporter, en particulier Nathalie, mes parents, mes grands-mères, mon frère et ma sœur.

--

Ce travail de thèse a été rendu possible grâce à une allocation spécifique du Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche, attribuée par l'Ecole normale supérieure, ainsi qu'aux financements propres au laboratoire, provenant de l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR) dans le cadre du second programme d'Investissements d'Avenir, du Labex LIFESENSES, du Conseil européen de la recherche (ERC), de la fondation BNP Paribas, de FAUN Stiftung et de LHW-Stiftung.

Table des matières

Remerciements	V
Abréviations	IX
Liste des symboles des molécules citées	XI
Index des figures et tableau	XIII
Préambule	XVI
Introduction	1
Problématique.....	12
I. La MGE, principal lieu de naissance des lignages d'interneurones à parvalbumine et à somatostatine chez la souris.....	13
A. Formation de neuroblastes GABAergiques dans les zones prolifératives et le manteau ..	14
B. Modalités temporelles dans les couches prolifératives et lignages d'interneurones à parvalbumine et à somatostatine	19
C. Modalités spatiales dans les zones prolifératives et lignages d'interneurones à parvalbumine et à somatostatine	21
D. Etudes clonales et lignages d'interneurones spécifiques de régions néocorticales	28
II. Migration tangentielle des neuroblastes GABAergiques issus de la MGE chez la souris ..	39
A. Migration tangentielle au sein de deux principaux flux	41
B. Structures anatomiques rencontrées pendant la migration tangentielle.....	44
C. Molécules diffusibles impliquées dans la migration tangentielle	48
D. Aspects subcellulaires de la migration tangentielle	55
III. Migration radiaire et intégration des interneurones provenant de la MGE chez la souris..	63
A. Entrée en migration radiaire.....	63
B. Fin de la migration et intégration des interneurones immatures dans des réseaux neuronaux.....	69
C. Programme apoptotique et maturation des neuroblastes GABAergiques en interneurones.....	71
IV. Développement des interneurones chez les primates.....	75
V. Protéines d'adhérence et développement des interneurones.....	81
A. Rôles des cadhérines dans le développement du système nerveux central, et en particulier celui des interneurones.....	82
B. Rôles des aGPCRs dans le développement du système nerveux central, et en particulier celui des interneurones.....	88
C. <i>Cdhr23</i> et <i>cdhr15</i> : deux protéines apparentées aux cadhérines opérant la transduction mécano-électrique dans les cellules ciliées.....	92
D. <i>Adgrv1</i> : un aGPCR impliqué dans le développement de la touffe ciliaire des cellules ciliées.....	95
Objectif du travail de thèse	99
Résultats	101
I. Des neuroblastes GABAergiques, du manteau de la MGE au cortex auditif présomptif, synthétisent <i>cdhr23</i> et <i>cdhr15</i> durant leurs migrations tangentielle et radiaire, chez la souris.....	103
II. <i>Cdhr23</i> et <i>cdhr15</i> sont nécessaires à l'entrée dans le cortex embryonnaire des neuroblastes GABAergiques qui les expriment, chez la souris.....	109
III. Les souris mutantes pour <i>Cdhr23</i> et <i>Cdhr15</i> ont moins d'interneurones à parvalbumine dans leur cortex auditif et sont prédisposées aux crises audiogènes	115
IV. L'invalidation conditionnelle de <i>Cdhr23</i> et <i>Cdhr15</i> dans la MGE ou de <i>Cdhr15</i> dans le cortex auditif est suffisante pour entraîner une diminution du nombre d'interneurones à parvalbumine dans le cortex auditif et une prédisposition aux crises audiogènes	119
V. <i>Adgrv1</i> est impliqué dans le développement des neuroblastes synthétisant <i>cdhr23</i> et <i>cdhr15</i>	123
VI. <i>Cdhr23</i> , <i>cdhr15</i> et <i>adgrv1</i> présentent des profils d'expression similaires dans le télencéphale embryonnaire de macaque	127

Discussion et perspectives	131
I. Cdhr23, cdhr15 et adgrv1 participent au développement des interneurons du cortex auditif : un exemple de « bricolage évolutif »	133
A. Apparition de la migration tangentielle dans le télencéphale et de l'expression de cdhr23 et cdhr15 au cours de l'évolution.....	134
B. Rôles de cdhr23, cdhr15 et adgrv1 dans le développement des interneurons chez la souris.....	137
C. Perspectives	141
II. Défauts intrinsèques dans le cortex auditif en l'absence d'expression de protéines considérées comme étant spécifiques des cellules sensorielles auditives	143
A. Absence d'interneurons à parvalbumine corticaux et disposition aux crises audiogènes chez la souris.....	145
B. Rôles des interneurons à parvalbumine et à somatostatine dans le cortex auditif	150
C. Troubles neurologiques, interneurons et modèles murins	155
D. Perspectives	162
III. Proposition : il existe des populations de neuroblastes GABAergiques adressés à des régions télencéphaliques précises selon un « code d'adhérence cellulaire »	165
Matériel et méthodes.....	169
<i>Animaux.</i>	171
<i>Tests auditifs.</i>	172
<i>Stimulations sonores.</i>	172
<i>Injection de vecteur lentiviral.</i>	173
<i>Anesthésie des souris.</i>	173
<i>Préparation des tissus.</i>	175
<i>Immuno-marquages.</i>	175
<i>Quantification des marquages sur tranches histologiques.</i>	178
<i>Cultures d'explants de MGE et quantification de la migration.</i>	178
<i>Analyses statistiques.</i>	180
Post-propos.....	XVIII
Article de thèse.....	XIX
Références.....	LXXXI

Abréviations

J'ai pris le parti de privilégier les abréviations anglaises. Dans cette table, est indiquée pour chaque abréviation sa signification en français, et en anglais quand il y a lieu.

I à VI	couches néocorticales I à VI
PEAs	potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral
CGE	éminence ganglionnaire caudale (<i>caudal ganglionic eminence</i>)
CP	plaque corticale (<i>cortical plate</i>)
OEAs	otoémissions acoustiques
EC	domaine extracellulaire de type cadhérine
En	<i>n</i> jours de vie embryonnaire
GAIN	domaine autoprotéolytique induit des récepteurs couplés aux protéines G (<i>G-protein-coupled receptor (GPCR) autoproteolysis-inducing domain</i>)
GW n	$n^{\text{ième}}$ semaine de gestation (<i>gestational week</i>)
IZ	zone intermédiaire (<i>intermediate zone</i>)
LGE	éminence ganglionnaire latérale (<i>lateral ganglionic eminence</i>)
(d/v)MGE	éminence ganglionnaire médiale (dorsale/ventrale) (<i>dorsal/ventral medial ganglionic eminence</i>)
MZ	zone marginale (<i>marginal zone</i>)
PBS	tampon phosphate salin (<i>phosphate-buffered saline</i>)
P n	<i>n</i> jours de vie postnatale
POA	aire préoptique (<i>preoptic area</i>) télencéphalique
SEM	écart-type à la moyenne (<i>standard error of the mean</i>)
(i/o)SVZ	zone sous-ventriculaire (interne/externe) (<i>inner/outer subventricular zone</i>)
USH1 et 2	syndrome de Usher de type I et de type II
VZ	zone ventriculaire (<i>ventricular zone</i>)

Liste des symboles des molécules citées

La plupart de ces symboles proviennent du National Center for Biotechnology Information (Etats-Unis). Je donne la plupart du temps leur signification en anglais. Si j'ai francisé le nom, j'indique entre parenthèse le nom en anglais.

5HTR3 _A	récepteur ionotropique à la sérotonine (<i>5-hydroxytryptamine receptor 3A</i>)
ackr3	<i>atypical chemokine receptor 3</i>
adgrc1-3	<i>adhesion G protein-coupled receptor C1-3</i> (cf. CELSR1-3)
adgrv1	<i>adhesion G protein-coupled receptor V1</i>
aGPCRs	récepteurs d'adhérence couplés aux protéines G (<i>adhesion G-protein-coupled receptors</i>)
akt1	<i>AKT serine/threonine kinase 1</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN(m)	acide ribonucléique (messenger)
arx	<i>aristaless related homeobox</i>
ascl1	<i>achaete-scute family bHLH transcription factor 1</i>
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
calb2	calbindine-2 ou calrétinine (<i>calbindin-2, calretinin</i>)
camsap3	<i>calmodulin regulated spectrin-associated protein 3</i>
casp3	<i>caspase-3</i>
cdc42	<i>cell division cycle 42</i>
cdhn	cadhérine- <i>n</i> (<i>cadherin-n</i>) ; pour cdh23, cf. cdhr23
cdhrn	protéine apparentée aux cadhérines <i>n</i> (<i>cadherin-related protein n</i>) pour cdhr23 et cdhr15, cf. cdh23 et pcdh15
cdk4, cdk6	<i>cyclin dependent kinase 4, 6</i>
CELSR1-3	<i>cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1-3</i> (cf. adgrc1-3)
cib2	<i>calcium and integrin binding family member 2</i>
cntn2	contactine-2 (<i>contactin-2</i>)
ctnnb1	<i>catenin (cadherin associated protein), β1</i> ou β-caténine (<i>β-catenin</i>)
ctnnd1	<i>catenin (cadherin associated protein), δ1</i> ou p120
cxcl12	<i>C-X-C motif chemokine ligand 12</i>
cxcr4	<i>C-X-C motif chemokine receptor 4</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
dcx	doublecortine (<i>doublecortin</i>)
diaph	<i>diaphanous related formin 1</i>
disc1	<i>disrupted in schizophrenia-1</i>
dlx1, dlx2, dlx5, dlx6	<i>distal-less homeobox 1, 2, 5, 6</i>
efna, efnb	éphrine (<i>ephrin</i>) de type a, de type bb
EGFP	cf. GFP
epha, ephb	récepteur aux éphrines (<i>ephrin receptor</i>) de type a, de type b
erbb4	<i>erb-b2 receptor tyrosine kinase 4</i>
FGF8	facteur de croissance fibroblastique-8 (<i>fibroblastic growth factor</i>)
FMR1	<i>fragile X mental retardation 1</i>
GABA	acide γ-aminobutyrique (<i>γ-aminobutyric acid</i>)
GABA _A , GABA _B	récepteurs ionotropiques au GABA de type A, de type B
GAD1, 2	décarboxylases de l'acide glutamique-1, 2 (<i>glutamic acid decarboxylase-1, 2</i>)
GAT1, GAT3	<i>GABA transporter 1, 3</i> (cf. slc6a1, slc6a13)
GDNF	<i>glial cell-derived neurotrophic factor</i>
(E)GFP	protéine fluorescente verte (augmentée) (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
GFRα1	<i>GDNF family receptor alpha 1</i>
gipc3	<i>GIPC PDZ domain containing family, member 3</i>

GJa1	<i>gap junction protein, alpha 1</i>
gli1-3	<i>GLI-Kruppel family member GLI1-3</i>
GPI	<i>glycosylphosphatidylinositol</i>
gsx1, gsx2	<i>GS homeobox 1, 2</i>
GTP	<i>guanosine triphosphate</i>
HGF	<i>facteur de croissance hépatocytaire (hepatocyte growth factor)</i>
HTR2C	<i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C</i>
kcc2	<i>potassium chloride cotransporter 2 (cf. slc12a5)</i>
LHFPL5	<i>lipoma HMGIC fusion partner-like 5</i>
lhx6	<i>LIM homeobox protein 6</i>
mecp2	<i>methyl CpG binding protein 2</i>
MTOR	<i>mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)</i>
myh10	<i>myosine non musculaire 10 (non muscular myosin-10)</i>
NCAM1	<i>molécule d'adhérence cellulaire neuronale-1 (neural cell adhesion molecule-1)</i>
nkcc1, nkcc2	<i>Na-K-Cl cotransporter 1 (cf. slc12a2), 2 (cf. slc12a1)</i>
nkx2.1	<i>NK2 homeobox 1</i>
nr2f2	<i>nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2</i>
nrg1, nrg3	<i>neuréguline-1, 3 (neuregulin-1, 3)</i>
nrp1, nrp2	<i>neuropiline-1, 2 (neuropilin-1, 2)</i>
ntf4	<i>neurotrophine-4 (neurotrophin-4)</i>
ntn1	<i>nétrine-1 (netrin-1)</i>
pafah1b1	<i>platelet activating factor acetylhydrolase 1b regulatory subunit 1</i>
pcdhn	<i>protocadhérine-n (protocadherin-n) ; pour pcdh15, cf. cdhr15</i>
PFA	<i>paraformaldéhyde</i>
plxna1	<i>pléxine-A (plexin-A)</i>
ptc1	<i>patched-1</i>
pten	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
pvalb	<i>parvalbumine (parvalbumin)</i>
RFP	<i>protéine fluorescente rouge (red fluorescent protein)</i>
rhoA	<i>ras homolog family member A</i>
robo1, robo3	<i>roundabout guidance receptor 1, 3</i>
satb1	<i>SATB homeobox 1</i>
scn1a	<i>sodium voltage-gated channel alpha subunit 1</i>
shh	<i>sonic hedgehog</i>
slc6a1, slc6a13	<i>solute carrier family 6 member 1 (cf. GAT1), 13 (cf. GAT3)</i>
slc12a1, 2, 5	<i>solute carrier family 12, member 1 (cf. nkcc2), 2 (cf. nkcc1), 5 (cf. kcc2)</i>
slit1 et 2	<i>slit homolog 1 et 2</i>
sema3a, 3f	<i>sémaphorine-3a, -3f (semaphorin-3a, 3f)</i>
smo	<i>smoothened</i>
SNAP25	<i>synaptosomal-associated protein 25</i>
sox2, sox6	<i>SRY (sex determining region Y)-box 2, 6</i>
sst	<i>somatostatine (somatostatin)</i>
tmc1, 2	<i>transmembrane channel-like gene family 1, 2</i>
tmie	<i>transmembrane inner ear</i>
trkB	<i>récepteur tyrosine kinase (tyrosine receptor kinase B)</i>
unc5b	<i>unc-5 netrin receptor B</i>
VIP	<i>peptide intestinal vasoactive (vasoactive intestinal peptide)</i>
YFP	<i>protéine fluorescente jaune (yellow fluorescent protein)</i>
zeb2	<i>zinc finger E-box binding homeobox 2</i>

Index des figures et tableau

Figure 1 Développement de l'encéphale humain.....	Page 4
Figure 2 Neurogenèse et migration des neuroblastes glutamatergiques et GABAergiques chez la souris....	Page 7
Figure 3 Différents lignages d'interneurones GABAergiques télencéphaliques chez la souris.....	Page 9
Figure 4 Types cardinaux d'interneurones GABAergiques néocorticaux chez la souris.....	Page 14
Figure 5 Prolifération dans les zones prolifératives de la MGE et production des interneurones synthétisant la parvalbumine ou la somatostatine chez la souris.....	Page 17
Figure 6 Modalités temporelles de la prolifération cellulaire dans la MGE chez la souris.....	Page 20
Figure 7 Sous-domaines dans les zones prolifératives des éminences ganglionnaires chez la souris.....	Page 24
Figure 8 Destination des interneurones de même origine clonale chez la souris.....	Page 37
Figure 9 Flux de migration tangentielle des neuroblastes GABAergiques issus de la MGE chez la souris.....	Page 42
Figure 10 Molécules diffusibles impliquées dans la migration tangentielle des neuroblastes GABAergiques à destination néocorticale.....	Page 52
Figure 11 Aspects subcellulaires de la migration tangentielle des neuroblastes GABAergiques.....	Page 59
Figure 12 Migration radiaire des neuroblastes GABAergiques chez la souris.....	Page 68
Figure 13 Développement postnatal des interneurones.....	Page 73
Figure 14 Développement cortical embryonnaire chez la souris et le macaque.....	Page 76
Figure 15 Profils d'expression des facteurs de transcription des éminences ganglionnaires chez l'embryon humain à 15 semaines de gestation.....	Page 79
Figure 16 Protéines d'adhérence impliquées dans le développement des interneurones.....	Page 98
Figure 17 Co-expression de <i>cdhr23</i> et <i>cdhr15</i> dans le subpallium à E13,5 chez la souris.....	Page 104
Figure 18 Immuno-marquages témoins.....	Page 105
Figure 19 <i>Cdhr23</i> et <i>cdhr15</i> sont co-exprimées dans des neuroblastes GABAergiques pendant leur migration tangentielle chez la souris.....	Page 105
Figure 20 <i>Cdhr23</i> et <i>cdhr15</i> sont co-exprimées dans les précurseurs d'interneurones issus de la MGE du cortex auditif chez la souris.....	Page 107
Figure 21 <i>Cdhr23</i> et <i>cdhr15</i> sont nécessaires à la migration des neuroblastes GABAergiques qui les expriment, chez la souris.....	Page 111
Figure 22 Préservation des flux de migration tangentielle chez les embryons des souris mutantes <i>Cdhr23</i> ^{-/-} et <i>Cdhr15</i> ^{-/-}	Page 111
Figure 23 Expression de <i>cdhr23</i> et <i>cdhr15</i> dans des neuroblastes issus d'explants de MGE chez la souris.....	Page 112
Figure 24 Les souris mutantes pour <i>Cdhr23</i> et <i>Cdhr15</i> ont un nombre réduit d'interneurones produisant la parvalbumine dans leur cortex auditif.....	Page 117
Figure 25 Les souris <i>Cdhr23</i> ^{+/-} et <i>Cdhr15</i> ^{+/av-3J} ont des PEAs et des OEAs des produits de distorsion normaux.....	Page 117
Figure 26 La diminution du nombre d'interneurones produisant la parvalbumine est restreinte au cortex auditif chez les souris mutantes <i>Cdhr23</i> ^{+/-} et <i>Cdhr15</i> ^{+/av-3J}	Page 118

Figure 27 La délétion conditionnelle de <i>Cdhr15</i> et <i>Cdhr23</i> dans la MGE est suffisante pour induire une disposition aux crises audiogènes et une diminution du nombre d'interneurones produisant la parvalbumine dans le cortex auditif.....	Page 120
Figure 28 La délétion <i>in situ</i> conditionnelle de <i>Cdhr15</i> est suffisante pour induire la manifestation de crises audiogènes et une diminution du nombre d'interneurones produisant la parvalbumine dans le cortex auditif.....	Page 122
Figure 29 Défauts de développement des neuroblastes GABAergiques co-exprimant <i>cdhr23</i> et <i>cdhr15</i> et des interneurones produisant la parvalbumine du cortex auditif chez les souris mutantes <i>Adgrv1^{-/-}</i>	Page 125
Figure 30 <i>Adgrv1</i> est impliqué dans la migration des neuroblastes GABAergiques synthétisant <i>cdhr23</i>	Page 126
Figure 31 Conservation de l'expression de <i>cdhr23</i> , <i>cdhr15</i> , et <i>adgrv1</i> dans la MGE et le cortex auditif d'embryons de macaque.....	Page 128
Figure 32 Profils d'expression de <i>cdhr23</i> , <i>cdhr15</i> et <i>adgrv1</i> dans le cortex auditif du macaque.....	Page 129
Figure 33 Conservation de la migration tangentielle dans le cortex des vertébrés et données sur l'expression de <i>cdhr23</i> et <i>cdhr15</i>	Page 137
Figure 34 Les neuroblastes GABAergiques du cortex auditif utilisent <i>cdhr23</i> et <i>cdhr15</i> pour pénétrer dans le néocortex.....	Page 144
Figure 35 Inhibitions anticipatrice et retour.....	Page 153
Tableau 1 Modèles génétiques de crises audiogènes.....	Pages 148-149

Préambule

En 1995, le premier gène responsable de surdité, codant pour la myosine-VIIa, fut identifié à la fois chez l'humain par Dominique Weil *et al.* dans le laboratoire de Christine Petit¹ et chez la souris par Fernando Gibson *et al.* dans le laboratoire de Steve Brown². Depuis, environ 100 autres gènes ont été identifiés comme responsables de surdités neurosensorielles isolées (non syndromiques). Ces gènes sont dans leur grande majorité exprimés dans les cellules sensorielles auditives de la cochlée, l'organe sensoriel de l'audition. Ces cellules sont dites cellules ciliées car elles présentent à leur apex un ensemble de villosités, ou stéréocils, appelé touffe ciliaire. **La perte d'expression des gènes de surdité dans les cellules sensorielles suffit à rendre compte du défaut auditif observé chez les patients.** L'étude du rôle des protéines pour lesquelles codent ces gènes a permis de déchiffrer bon nombre des mécanismes moléculaires qui sous-tendent les fonctions des cellules ciliées. Par exemple, Piotr Kazmierczak et Hirofumi Sakaguchi *et al.*, dans les laboratoires d'Ulrich M ller et Bechara Kachar, ont montré en 2007 que deux protéines apparentées aux cadhérines, *cdhr23* et *cdhr15*, forment des liens interst r ociliaires apicaux dans les cellules cili es³. Ces liens apicaux opèrent la transduction mécano-électrique permettant de transduire une onde sonore en signal électrique. En l'absence de *cdhr23* ou *cdhr15*, les liens apicaux disparaissent, ce qui entraîne une surdité profonde. *Adgrv1*, un récepteur d'adhérence couplé aux protéines G, a été identifié comme formant les liens interst r ociliaires temporaires baso-latéraux en 2006 par Joann McGee *et al.* dans le laboratoire de Guy Richardson et en 2007 par Nicolas Michalski et Vincent Michel *et al.* dans le laboratoire de Christine Petit^{4,5}. Les liens baso-latéraux participent à la morphog nese de la touffe ciliaire. En l'absence d'*adgrv1*, la touffe ciliaire présente une morphologie anormale, ce qui entraîne une surdité modérée à sévère.

L'absence d'expression dans les cellules sensorielles auditives des gènes responsables de surdité isolée permettant de rendre compte des défauts auditifs, le rôle possible de ces gènes dans le système nerveux central a été peu considéré. Si une expression de certains d'entre eux y a été décrite, leur rôle précis n'a pas été exploré, encore moins dans le cortex auditif. *Adgrv1* a été décrit dans la gaine de myéline de neurones du colliculus inférieur, une région sous-corticale du système auditif, en 2013 par Daesung Shin *et al.* dans le laboratoire de Louis Pt  ek⁶ ; *tbc1d24* a été associé à des anomalies de migration de neurones corticaux en 2014 par Antonio Falace *et al.* dans le laboratoire de Carlos Cardoso⁷ ; l'otoferline a été détectée dans les interneurones inhibiteurs néocorticaux en 2006 par Nicola Schug *et al.* et en 2015 par Wu Wu *et al.* dans les laboratoires de Marlies Knipper et Zongchao Jia^{8,9}.

Au cours de mon travail de doctorat, j'ai étudié l'expression dans le développement du système nerveux central de *cdhr23*, *cdhr15* et *adgrv1*. **Cette étude m'a conduit à étudier le rôle de *cdhr23* et *cdhr15* dans le développement des interneurones inhibiteurs du cortex auditif.** Les résultats que j'ai obtenus indiquent premièrement l'existence de défauts primaires de ces interneurones dans le cortex auditif de souris mutantes modélisant une surdité héréditaire, en plus du défaut de l'organe périphérique de l'audition. C'est la première fois qu'un tel défaut intrinsèque au système nerveux central est décrit dans un modèle animal de surdité héréditaire d'origine périphérique. Deuxièmement, *cdhr23* et *cdhr15* sont exprimées spécifiquement par les précurseurs d'interneurones inhibiteurs du cortex auditif. C'est la première fois qu'une population de précurseurs d'interneurones néocorticaux restreinte à une aire néocorticale est observée.

Ce manuscrit de thèse débute par une présentation des connaissances actuelles concernant le développement des interneurones inhibiteurs néocorticaux, de leur naissance à leur intégration dans un réseau neuronal. Je présente et discute ensuite les résultats de mon travail de recherche.

Introduction

Au cours du développement du **système nerveux central** des vertébrés, trois vésicules se forment dans la partie antérieure du **tube neural** lors de sa fermeture. La vésicule la plus antérieure est le prosencéphale (il deviendra le cerveau), qui donnera le **télocéphale** (formé de ses deux hémisphères cérébraux) et le **diencéphale** (comprenant le **thalamus**, l'hypothalamus, l'épithalamus). Viennent ensuite plus postérieurement le mésencéphale et le rhombencéphale, qui forment le cervelet et le tronc cérébral. Ces vésicules constitueront le futur encéphale qui contient environ 71 millions de neurones chez la souris – *Mus musculus* –¹⁰ et 86 milliards de neurones chez l'humain – *Homo sapiens*¹¹⁻¹⁴. Le télencéphale inclut chez tous les vertébrés les bulbes olfactifs dans sa partie antérieure, les ganglions de la base (dont le **striatum** et le **globus pallidus**, qui contrôlent les mouvements, la mémoire procédurale, les comportements de routine et les émotions) dans sa partie ventrale (**le subpallium**), et le **cortex cérébral** en superficie (**le pallium**). Le cortex cérébral comprend l'archicortex (dont l'hippocampe et les cortex entorhinal, rétrospinal et le subiculum, impliqués dans la mémoire et la navigation spatiale), le paléocortex (dont le cortex pyriforme olfactif, le cortex insulaire et l'amygdale, impliqués, respectivement, dans l'olfaction, le goût et les émotions). Chez les mammifères, il comprend en plus le **néocortex**, situé dans la partie dorsale du pallium^{13,15}, qui contient 6% des neurones de l'encéphale chez la souris et 13% chez l'humain¹⁶. Le néocortex comprend les cortex visuel, somatosensoriel, auditif, moteur, et est constitué des cortex liés aux tâches cognitives complexes. Chez les mammifères, les **structures télencéphaliques** comprennent donc les bulbes olfactifs, les ganglions de la base, le cortex cérébral dont le néocortex, l'archicortex et le paléocortex (**Figure 1**).

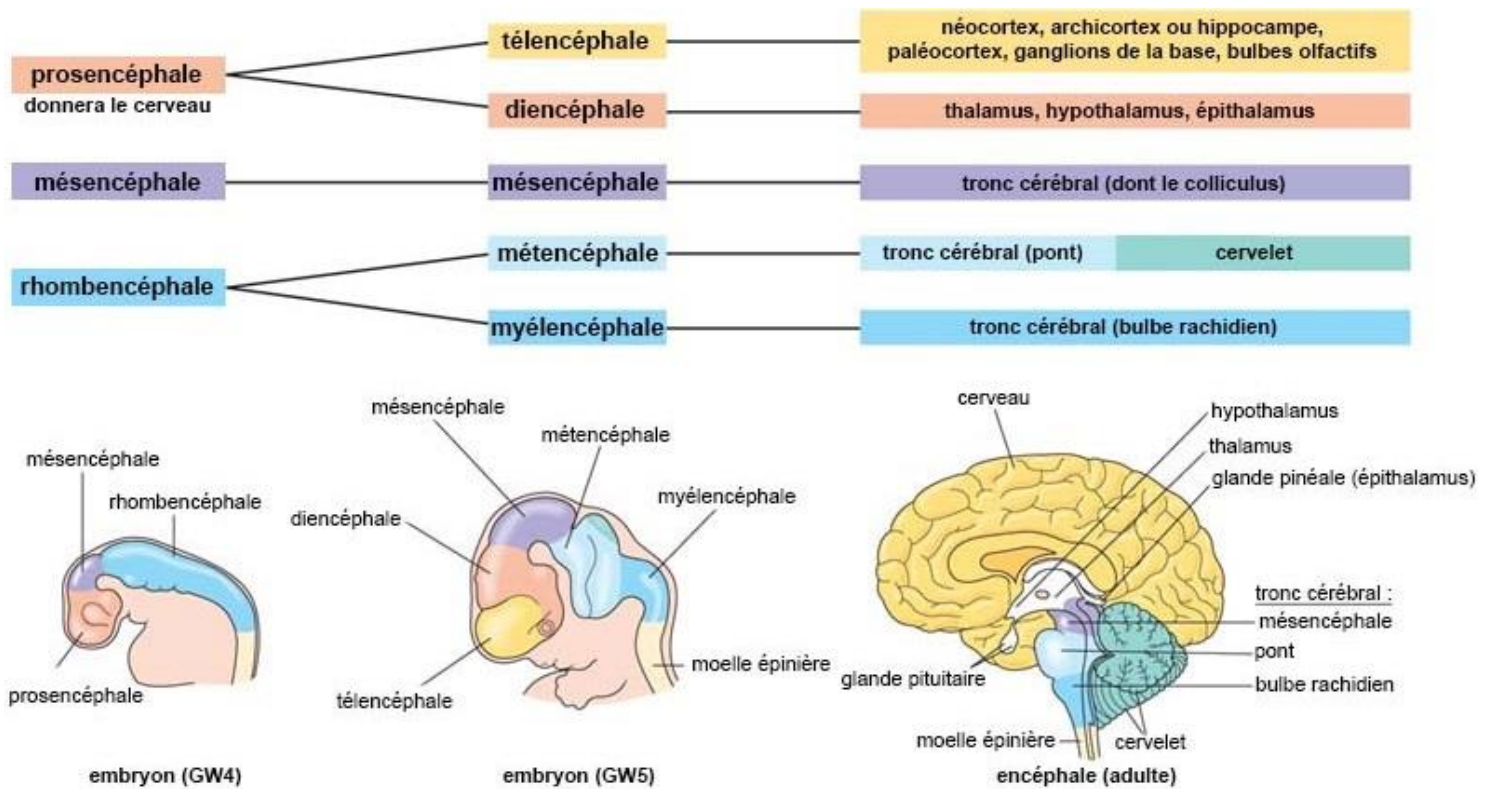


Figure 1 Développement de l'encéphale humain. Les trois premières vésicules cérébrales formées après la fermeture du tube neural (prosencephale, mésencéphale, rhombencéphale) donnent plusieurs vésicules secondaires, à l'origine des différentes structures de l'encéphale. Par exemple, le prosencephale (qui deviendra le cerveau) donne en partie le télencéphale comprenant le néocortex, l'hippocampe, le paléocortex, les ganglions de la base et les bulbes olfactifs. Abréviations : semaine de vie embryonnaire (**GW**, pour *gestation week*). Adapté de Singleton¹⁷.

Lorsque le tube neural se ferme (entre 8,5 et 10 jours de vie embryonnaire – E8,5-E10 – chez la souris¹⁸, entre E24 et E28 chez l'humain¹⁹), le futur encéphale n'est constitué que d'une seule couche de cellules autour de la lumière (i.e. l'espace intérieur circonscrit par la couches de cellules) du tube neural : **la zone ventriculaire**. Les cellules de la zone ventriculaire (**progéniteurs apicaux** également connus sous le nom de **cellules de la glie radiaire**) forment un épithélium pseudostratifié, et chacune forme un long processus basal orienté radialement. La plupart de ces cellules sont en mitose : la zone ventriculaire est une couche proliférative. Chaque cellule mitotique donne naissance à une cellule qui reste à proximité de la surface ventriculaire et deviendra un nouveau progéniteur apical, et à une autre cellule qui entre en phase post-mitotique (**neuroblaste**). Cette dernière s'éloigne de la zone ventriculaire le long du processus radial du progéniteur puis se différencie²⁰. On parle de **division asymétrique** puisque les deux cellules filles n'ont pas le même devenir quant au cycle cellulaire (progéniteur vs. neuroblaste). Les deux cellules filles n'héritent pas du même matériel protéique et d'ARN ; le futur progéniteur hérite du centriole maternel associé au cil primaire et du processus basal²¹.

Dans le néocortex, les progéniteurs donnent naissance aux neurones synthétisant et sécrétant le principal neurotransmetteur excitateur, **le glutamate** (neurones glutamatergiques) ainsi qu'aux **astrocytes** et une partie des **oligodendrocytes**²²⁻²⁴, soit des cellules gliales. **Les neurones glutamatergiques** (principalement les **neurones pyramidaux**) représentent 85% des neurones néocorticaux chez les rongeurs et entre 62% et 75% de ces neurones chez les primates²⁵⁻²⁷. Ces neurones glutamatergiques sont organisés en six couches cellulaires formant une **colonne néocorticale** qui se présente comme un module fonctionnel élémentaire²⁸ (0,3 mm de diamètre contenant 7500 neurones environ chez les rongeurs^{27,29,30}), schéma conservé chez tous les mammifères. Tous les neurones glutamatergiques d'une colonne proviennent d'un petit nombre de progéniteurs. Les corps cellulaires des neurones pyramidaux qui naissent en premier (entre E11 et environ E15,5 chez la souris, chez l'humain entre 8 et 20 semaines de vie embryonnaire – GW (pour *gestation week*) 8 et GW20³¹) occupent les couches néocorticales les plus profondes (V, VIa et VIb). Ces neurones projettent vers les ganglions de la base et les régions sous-corticales (dont le thalamus et le tronc cérébral). Ceux qui naissent en dernier (entre environ E15,5 et E18 chez la souris, entre environ GW15 et GW30 chez l'humain³¹) occupent les couches les plus superficielles (II et III). Ils projettent vers d'autres colonnes corticales au sein des hémisphères ipsi- et contra-latéraux. La couche superficielle (I) ne contient pas de neurones glutamatergiques. Les neurones glutamatergiques de la couche IV, les cellules étoilées épineuses (en anglais, *spiny stellate cells*) ou interneurones glutamatergiques reçoivent des afférences du thalamus et projettent leurs axones au sein de leur propre colonne corticale^{22,27}.

Au cours du développement cérébral, une seconde couche de cellules prolifératives apparaît dans certaines régions encéphaliques (dans le télencéphale : le néocortex et le subpallium) : **la zone sous-ventriculaire**. Les cellules de la zone sous-ventriculaire, **les progéniteurs basaux ou intermédiaires**, ne se comportent pas comme celles de la zone ventriculaire : elles ne forment pas un épithélium pseudostratifié, et leur processus basal est court et confiné dans la zone sous-ventriculaire. Les progéniteurs basaux sont issus de

divisions asymétriques des progéniteurs apicaux dans la zone ventriculaire. Le mode de division des progéniteurs basaux est surtout symétrique (**divisions symétriques**), c'est-à-dire que les deux cellules filles sont deux neuroblastes^{20,21}. Cette couche est particulièrement développée dans le subpallium, formant trois protubérances (à partir de E11 chez la souris^{32,33} et à partir de GW7 chez l'humain) appelées **éminences ganglionnaires** (latérale, médiale, et caudale, auxquelles est ajoutée une aire non protubérante, l'aire préoptique ou POA, pour *preoptic area*). Chez tous les vertébrés, ces protubérances donnent naissance aux neurones des ganglions de la base et à une partie de ceux de l'amygdale³⁴⁻³⁷.

L'éminence ganglionnaire latérale (LGE, pour *lateral ganglionic eminence*) donne naissance aux neurones périglomérulaires et aux interneurones granulaires des bulbes olfactifs pendant la période embryonnaire et aussi chez l'adulte (ils migrent jusqu'aux bulbes olfactifs en une voie de migration rostrale)³⁸⁻⁴². Chez les mammifères, les éminences ganglionnaires donnent en plus naissance aux futurs neurones néocorticaux synthétisant et sécrétant le principal neurotransmetteur inhibiteur, **l'acide γ-aminobutyrique (interneurones GABAergiques**, que je nommerai à partir de ce point **interneurones**) et à une partie des oligodendrocytes et des astrocytes^{23,24,43-53}. Notons que les neurones de projection striataux sont issus de la LGE, que ceux du globus pallidus sont issus des éminences ganglionnaires médiales et caudales, qui donnent aussi les interneurones des ganglions de la base. Les neuroblastes GABAergiques à destination corticale migrent latéralement des éminences ganglionnaires jusqu'au néocortex dans un plan tangent à la zone ventriculaire (**migration tangentielle**), puis radialement à la zone ventriculaire néocorticale lorsqu'ils ont atteint leur colonne néocorticale finale (**migration radiaire**). Ensuite, ils s'intègrent à des microcircuits neuronaux, notamment en faisant synapse, et achèvent leur maturation^{25,45-48,54-56} (**Figure 2**). Chez la souris, il faut attendre au moins 40 jours après la naissance (P40) pour que les interneurones soient complètement matures. On notera que les futurs interneurones de l'hippocampe empruntent les mêmes voies de migration⁵⁷.

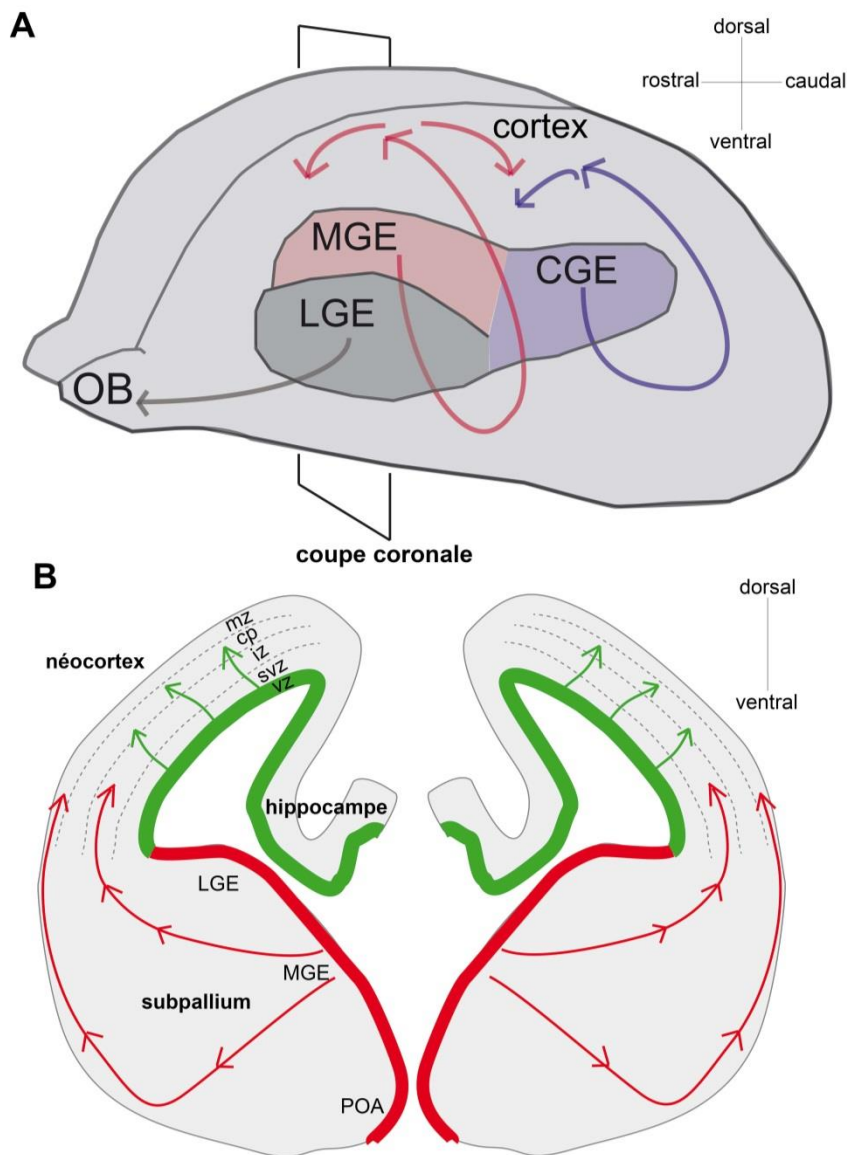


Figure 2 Neurogenèse et migration des neuroblastes glutamatergiques et GABAergiques chez la souris. A, Cerveau de souris à E13,5-E15,5 illustrant la migration tangentielle des interneurons GABAergiques, de la LGE vers les bulbes olfactifs (**OB**), de la MGE et de la CGE vers le cortex cérébral. **B,** Coupe coronale de télencéphale dans la région de la LGE et de la MGE à E14,5. La zone ventriculaire (**vz**) néocorticale est en vert et celle du subpallium en rouge. La migration radiaire des neuroblastes glutamatergiques est représentée par des flèches vertes ; la migration tangentielle des neuroblastes GABAergiques issus de la MGE à destination néocorticale par des flèches rouges. Abréviations : zone sous-ventriculaire (**svz**), zone intermédiaire (**iz**), plaque corticale (**cp**) et zone marginale (**mz**). **A** adapté de Faux *et al.*, 2012²⁵.

Chez les rongeurs, l'**éminence ganglionnaire médiale (MGE)**, pour *medial ganglionic eminence*) produit environ 60% des interneurons, dont deux types sont caractérisés par la synthèse (mutuellement exclusive) de la **parvalbumine (pvalb)**, un tampon calcique, pour 65% d'entre eux (soit 39% des interneurons), et la **somatostatine (sst)**, un neuropeptide, pour 35% d'entre eux (soit 21% des interneurons)⁵⁷⁻⁶⁵. L'**éminence ganglionnaire caudale (CGE)**, pour *caudal ganglionic eminence*) produit 30% des interneurons caractérisés par la synthèse du récepteur ionotrope à la sérotonine 5HT_{3A} dont 40% (soit 12% des interneurons) synthétisent aussi le peptide intestinal vasoactif (VIP, pour *vasoactive*

intestinal peptide)^{58,63,64,66-69}. L'**aire préoptique** produit 10% des interneurons ; ils synthétisent la parvalbumine et la somatostatine de manière mutuellement exclusive^{58,63,70-73} (**Figure 3**). Certains ont proposé le fait que la LGE serait également une source d'interneurones, mais cette proposition n'a pas reçu de validation expérimentale ; il est probable qu'il s'agisse en fait de neuroblastes provenant de la MGE en transit dans la LGE qui ait été observés^{46-48,58,74}. J'aborderai plus loin les particularités du développement des interneurons chez les primates, chez lesquels un plus grand nombre d'interneurones, ainsi que de nouveaux types d'interneurones par rapport aux rongeurs, sont observés (**Partie IV**).

Il existe donc quatre **types cardinaux d'interneurones** chez les rongeurs : ceux qui synthétisent la parvalbumine (40% des interneurons, **interneurones à parvalbumine**), ceux qui synthétisent la somatostatine (30%, **interneurones à somatostatine**), ceux qui synthétisent le 5HTR3_A mais pas le VIP (18%, **interneurones à 5HTR3_A/non-VIP**) et ceux qui synthétisent le 5HTR3_A et le VIP (12%, **interneurones à VIP**)^{75,76}. On a décrit par ailleurs d'autres marqueurs non mutuellement exclusifs, qui peuvent être synthétisés en plus des précédents : le tampon calcique **calbindine-2 (calb2** ou calrétinine) produit par certains interneurons à somatostatine (provenant de la MGE dorsale^{77,78}) et à VIP (la calbindine-2 est souvent considérée comme un marqueur des interneurons issus de la CGE, bien que certains interneurons à somatostatine en produisent aussi), l'hormone cholécystokinine par certains interneurons à 5HTR3_A (à VIP ou non), le neuropeptide Y synthétisé par certains interneurons à somatostatine (provenant de la MGE et de l'aire préoptique^{77,79}), la choline acétyltransférase par certains interneurons à VIP, la reeline et l'oxyde nitrique synthase synthétisées par certains interneurons à somatostatine/neuropeptide Y (provenant de la MGE et de l'aire préoptique^{77,79,80}) et à 5HTR3_A/non-VIP⁷⁶. De plus, la calbindine-1, un tampon calcique, est exprimée par environ 10% des interneurons, dont le type n'est pas précisé, ainsi que dans des neurones glutamatergiques⁸¹ (**Figures 3 et 4**). Notons l'existence de neurones pyramidaux de la couche néocorticale V qui expriment la parvalbumine de manière transitoire dans le cerveau immature^{82,83}.

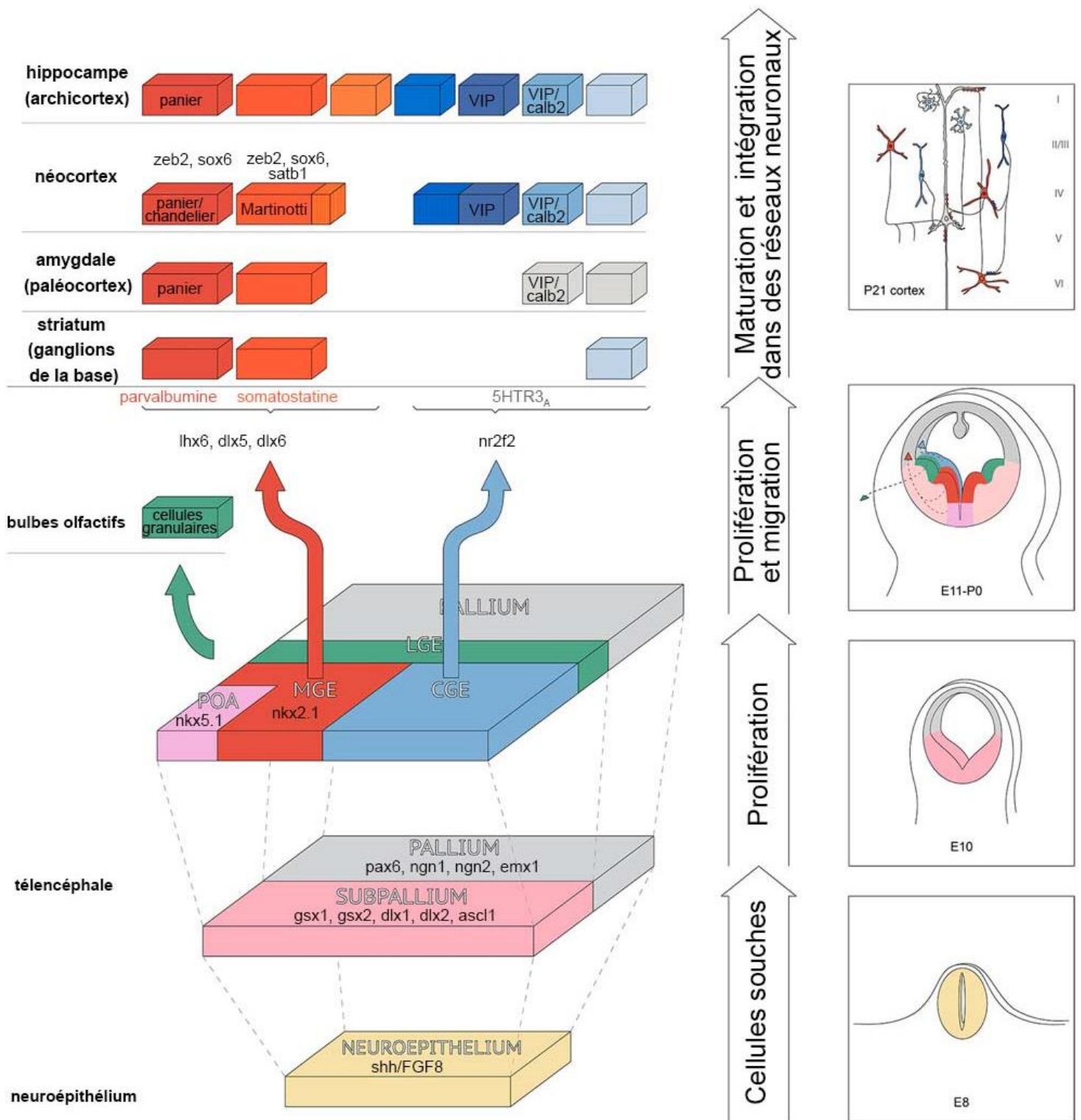


Figure 3 Différents lignages d'interneurones GABAergiques télencéphaliques chez la souris. Les interneurones GABAergiques du télencéphale naissent dans le subpallium, partie ventrale du télencéphale caractérisée par un gradient ventro-dorsal décroissant de *shh* et *FGF8*. Plus particulièrement, ils naissent dans l'éminence ganglionnaire médiale (**MGE**), l'éminence ganglionnaire caudale (**CGE**) et l'aire préoptique (**POA**) entre E11,5 et E18,5. Après leur naissance, ils migrent vers leur structure télencéphalique de destination, puis poursuivent leur maturation et s'intègrent à un réseau. 65% des interneurones GABAergiques néocorticaux naissent dans la MGE, qui correspond au territoire d'expression de *nkx2.1*. Ces interneurones synthétisent la parvalbumine (ils sont en panier ou en chandelier) ou la somatostatine (ils sont de Martinotti ou non de Martinotti). Ils synthétisent entre autres comme facteurs de transcription : *lhx6, dlx5, dlx6, zeb2* et *sox6*. Adapté de Kepecs & Fishell, 2014⁵⁹.

Dans le néocortex, les neurones glutamatergiques des couches néocorticales (II à VIb) synthétisent des marqueurs moléculaires différents. De plus, on décompte aujourd'hui entre vingt et soixante-dix sous-types d'interneurones, en fonction de critères moléculaires, morphologiques, physiologiques, de localisation, et des compartiments cellulaires des neurones avec lesquels ils font synapse^{22,56,84-88}. Les couches néocorticales n'ont pas la même épaisseur en fonction des aires fonctionnelles (par exemple, dans les aires sensorielles, la couche IV est plus épaisse et les couches V/VI le sont moins par rapport aux aires motrices). La distribution des interneurones diffère d'une aire fonctionnelle à une autre : par exemple, les interneurones à somatostatine sont en général localisés dans les couches néocorticales V-VI alors que dans le cortex auditif ils se répartissent de manière homogène entre les couches^{89,90}. Comment expliquer cette grande diversité, alors que tous les neurones proviennent de la zone ventriculaire du tube neural ? Chaque progéniteur le long du tube neural n'est pas soumis à un même environnement local, et à chaque cycle cellulaire (il y en a environ 11 chez la souris entre E10 et E17, et 35 chez l'humain entre GW5 et GW30^{20,91}), les nouveaux progéniteurs sont soumis à de nouveaux environnements locaux. Chaque progéniteur sera à l'origine de populations neurales synthétisant des marqueurs moléculaires différents, qui permettent de suivre des **lignages cellulaires**.

Lors de la fermeture du tube neural, des gradients de concentration de morphogènes selon l'axe antéro-postérieur ou dorso-ventral confèrent à chaque progéniteur, qui les détecte, une identité selon ces deux axes⁹². Il existe par exemple un gradient antéro-postérieur croissant de la glycoprotéine **wnt** le long du tube neural et des cellules dans la partie antérieure de l'embryon, à la frontière entre le tube neural et l'ectoderme non neural, qui promeuvent une « **identité neurale antérieure** ». Cette identité permet l'apparition du télencéphale¹³. Il existe dans le télencéphale un gradient dorso-ventral décroissant, notamment dans le pallium, de la *bone morphogen protein* (BMP), et un gradient ventro-dorsal décroissant, notamment dans le subpallium, du morphogène **sonic hedgehog (shh)**⁹³ et du facteur de croissance fibroblastique-8 (FGF8)¹³ (**Figure 3**). Shh est le seul membre de la famille des glycoprotéines *hedgehog* (hérisson en français) à être exprimé dans le

système nerveux central. Ce morphogène interagit avec un complexe moléculaire comprenant le récepteur à 12 domaines transmembranaires *patched-1* (*ptc1*) et le récepteur à 7 domaines transmembranaires *smoothened* (*smo*). Les cellules qui répondent à *shh* synthétisent les facteurs de transcription en doigt de zinc *gli1* et *gli2*, en amont de la voie *shh*, et inhibent *gli3*, inhibiteur lui-même de *gli1*. A ces gradients s'ajoute l'intervention de facteurs de transcription, comme *sox2*, qui est nécessaire à l'expression de marqueurs ventraux⁹⁴. Ainsi les cellules acquièrent une « **identité palliale ou subpalliale** ».

Cette identité va s'exprimer tout d'abord par l'expression de différents gènes homéotiques : *Emx1* et *Pax6* dans le pallium⁹⁵, *Gsx2* (*Gsh2*) principalement dans la future LGE⁹⁶⁻¹⁰⁰, et dont l'expression y persiste chez l'adulte¹⁰¹, *Gsx1* (*Gsh1*) principalement à la frontière entre les futures LGE et MGE^{97,98,100,102,103}, *Nkx2.1* (*Ttf1*) dans les futures MGE et aire préoptique^{57,96,104-106}, *Nkx5.1* dans la partie ventrale de l'aire préoptique^{13,59}. Des gènes codant pour des facteurs de transcription à motif hélice-boucle-hélice ont également une expression régionalisée et leur rôle est interdépendant des gènes homéotiques : *Ngn1/Ngn2* dans le pallium, *Ascl1* (*Mash1*) dans les futures LGE et MGE¹⁰⁷. ***Nkx2.1* et *Ascl1* participent tous deux à l'établissement d'« une identité MGE »**^{13,59}. En aval de l'expression d'*Ascl1*, les gènes homéotiques de la famille *distal-less* s'expriment dans le subpallium : ***Dlx2* et *Dlx1***^{99,100,108,109} dans les zones prolifératives, et en aval ***Dlx5* et *Dlx6***¹¹⁰ dans la zone sous-ventriculaire et les neuroblastes¹¹¹. Ces facteurs de transcription participent à l'acquisition de l'« **identité GABAergique** » des neurones^{13,59,112}. En aval de l'expression de *Nkx2.1*, le gène homéotique ***Lhx6***^{61,113} est nécessaires à l'acquisition de l'« **identité parvalbumine ou somatostatine** » des interneurones^{13,59,114-118} (Figure 3).

L'établissement de cartes d'expression de gènes homéotiques et de facteurs de transcription au cours du développement du subpallium a permis d'identifier au moins dix-huit sous-domaines dans les zones prolifératives des éminences ganglionnaires, dont cinq dans la MGE¹¹². En étudiant le devenir des neuroblastes issus de ces sous-domaines, éventuellement chez des animaux dont des gènes homéotiques ou des gènes de facteurs de transcription ont été invalidés, ces cartes permettent d'établir que le type cardinal d'interneurone est déterminé dès les éminences ganglionnaires⁵⁹. Cependant, une question reste ouverte concernant le devenir des interneurones : est-il déterminé dès leur naissance dans les éminences ganglionnaires ? **C'est-à-dire, existe-t-il des lignages cellulaires pour chaque sous-type d'interneurone** (défini par des critères morphologiques et physiologiques) **et pour des destinations finales différentes** (à l'échelle de la colonne néocorticale, ou du moins de l'aire fonctionnelle) ?

A ce jour, aucune population d'interneurones n'a été identifiée comme étant spécifique d'une aire fonctionnelle néocorticale. De même, aucune invalidation de gène n'a révélé une diminution en nombre d'interneurones dans une aire fonctionnelle néocorticale donnée⁵⁹. **Mon travail de thèse démontre chez la souris qu'une population d'interneurones à parvalbumine, provenant de la MGE, est spécifique du cortex auditif. Dans l'introduction, je décrirai les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'établissement des différents lignages d'interneurones connus issus de la MGE (Partie I), leur migration tangentielle (Partie II), puis leur migration radiaire, suivie de leur intégration et leur maturation dans des microcircuits néocorticaux (Partie III), en abordant les points communs et les différences entre les rongeurs et les primates (Partie IV). Je décrirai certaines familles de protéines d'adhérence qui interviennent dans le développement des interneurones, ainsi que trois autres protéines que j'ai étudiées, connues comme étant synthétisées dans les cellules sensorielles auditives (Partie V).**

I. La MGE, principal lieu de naissance des lignages d'interneurones à parvalbumine et à somatostatine chez la souris

La MGE donne naissance à 80% des interneurones à parvalbumine et à somatostatine⁷⁶ (le reste est produit dans l'aire préoptique). Les interneurones à parvalbumine sont de deux sous-types morphologiques différents : **en panier** ou **en chandelier**. Les interneurones en panier sont localisés dans les couches néocorticales II à VI, principalement dans les couches IV et V. Ils forment des connexions synaptiques avec des neurones pyramidaux ou d'autres interneurones à parvalbumine au niveau de leur corps cellulaire et de leurs dendrites, et ont une décharge rapide de potentiels d'action (en anglais, il s'agit des *fast-spiking basket neurons*). Les interneurones en chandelier sont localisés dans les couches II et VI, font synapse avec les neurones pyramidaux au niveau de leur segment axonal initial. Ils déchargent rapidement, mais moins cependant que les interneurones en panier. Les interneurones à somatostatine sont eux aussi de deux sous-types différents : ils sont dits **de Martinotti** ou dits **non de Martinotti**. Les interneurones de Martinotti ont un plexus axonal en couche I, leurs corps cellulaires sont localisés dans les couches II à VI et principalement en couche V. Ils ont une décharge lente de potentiels d'action. Les interneurones non de Martinotti n'ont pas de plexus axonal en couche I, sont localisés dans les couches IV et V, et déchargent rapidement. Les deux types font des connexions synaptiques avec les neurones pyramidaux, principalement au niveau de leurs dendrites (**Figures 4**, cf. **Figure 35**).

Chacun de ces sous-types pourrait être encore subdivisé en plusieurs catégories. De plus, des différences existent pour ces populations entre différentes régions télencéphaliques. Quelle est l'origine de ces différents lignages ?

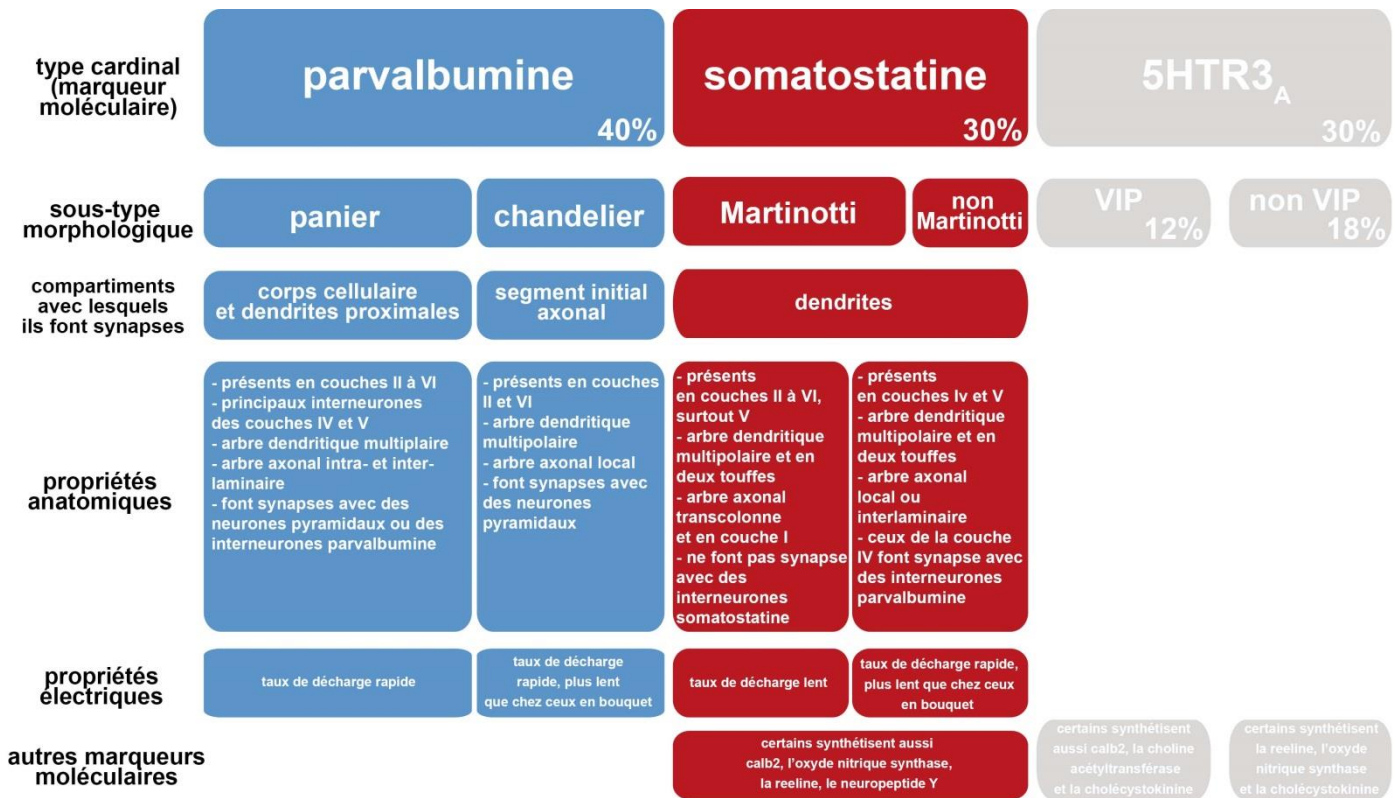


Figure 4 Types cardinaux d'interneurons GABAergiques néocorticaux chez la souris. Tous les interneurons GABAergiques néocorticaux synthétisent trois marqueurs moléculaires distincts non chevauchants : la parvalbumine, la somatostatine et le récepteur ionotropique 5HTR_{3A}. Il existe des sous-types selon des critères morphologiques (en panier, en chandelier, de Martinotti, non de Martinotti), moléculaires (synthétisant le VIP ou non), en fonction des compartiments des neurones cibles avec lesquels ils font synapse, et en fonction de critères électrophysiologiques. Adapté de Tremblay *et al.*, 2016⁷⁶.

A. Formation de neuroblastes GABAergiques dans les zones prolifératives et le manteau

Une des approches pour étudier la naissance des neuroblastes GABAergiques dans la MGE a consisté en l'étude des **cyclines**, protéines participant au cycle cellulaire. Les cyclines tiennent leur nom de leur expression périodique au cours du cycle cellulaire. Cette expression à différentes étapes du cycle cellulaire, et leur action via des kinases, permet de coordonner la fin de la réplication de l'ADN ainsi que la division cellulaire. Dans le télencéphale, les cyclines de type D (**cycline-D1**, **cycline-D2** et cycline-D3) ont été particulièrement étudiées. Exprimées en réponse à des facteurs de croissance, elles font le lien entre l'environnement cellulaire et la machinerie du cycle cellulaire, en activant les

kinases dépendantes des cyclines, cdk4 et cdk6 (elles activent ces kinases en formant des complexes avec elles). Les cyclines de type D promeuvent la prolifération cellulaire par leur activité catalytique et contrôlent par ailleurs la transcription de gènes impliqués dans la migration cellulaire. Parmi ces gènes, ceux trouvant ceux codant pour les thrombospondines, les kinases associées aux petites rho GTPases dont font partie **cdc42** et **rhoA**, qui sont impliquées dans la prolifération cellulaire dans la MGE et la survie des progéniteurs¹¹⁹, **rac1**, qui est impliquée dans la sortie du cycle cellulaire dans la MGE et la migration des neuroblastes GABAergiques qui en sont issus^{120,121}, ou encore la filamine-A, qui est une protéine qui se lie à l'actine. Elles inhibent également l'apoptose opérée par la caspase-3, soit en inhibant l'action du récepteur transmembranaire FAS, soit en séquestrant la protéine pro-apoptotique BAX^{122,123}.

Dans le télencéphale murin, la cycline-D1 est exprimée dans les cellules de la zone ventriculaire, alors que la cycline-D2 l'est dans la zone sous-ventriculaire^{124,125}. Les mutants homozygotes déficients pour l'une ou l'autre de ces deux cyclines présentent des phénotypes différents : l'absence de la cycline-D1 entraîne une diminution de la taille du territoire exprimant *Nkx2.1* et *Ascl1* et n'induit pas de diminution de la densité en interneurons à parvalbumine et à somatostatine dans le cortex. Au contraire, l'absence de la cycline-D2 n'entraîne pas de diminution de surface du territoire exprimant *Nkx2.1* et *Ascl1* mais induit une diminution de la proportion d'interneurons à parvalbumine (de -30% des interneurons générés à E13,5 à -53% des interneurons générés à E14-E15), seulement. Pourquoi de telles différences ? En l'absence de la cycline-D1, la cycline-D2 s'exprime à sa place, et le nombre de progéniteurs n'est pas modifié, alors qu'en l'absence de la cycline-D2, le nombre de progéniteurs est fortement réduit dans la zone sous-ventriculaire et dans une moindre mesure dans la zone ventriculaire¹²⁶, c'est-à-dire que le nombre de progéniteurs basaux est réduit tandis que le nombre de progéniteurs apicaux reste inchangé.

Ces études suggèrent que la cycline-D2 est nécessaire à l'établissement des progéniteurs intermédiaires de la zone sous-ventriculaire, ce qui a été confirmé dans le néocortex^{124,127}. Elles ont conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle les progéniteurs

apicaux de la zone ventriculaire produisent préférentiellement des interneurones à somatostatine et les progéniteurs intermédiaires de la zone sous-ventriculaire des interneurones à parvalbumine. Les progéniteurs apicaux ont ainsi été marqués grâce un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur du gène de la tubuline- α 1, et par conséquent tous les neurones qui en sont issus. Parmi ces neurones marqués, les interneurones à somatostatine sont deux fois plus représentés que les interneurones à parvalbumine alors que dans le néocortex, ce rapport est normalement inversé. Cela indique que les progéniteurs apicaux donnent préférentiellement des interneurones à somatostatine. En parallèle, le nombre de progéniteurs intermédiaires a été réduit en bloquant la voie de signalisation notch. Dans ce cas, les progéniteurs apicaux donnent davantage de neuroblastes que de progéniteurs basaux. Là encore, les interneurones à somatostatine sont deux fois plus représentés que ceux à parvalbumine¹²⁸, renforçant à nouveau l'idée que les progéniteurs apicaux génèrent préférentiellement des interneurones à somatostatine.

Une étude récente conforte cette hypothèse. Les auteurs ont voulu générer des interneurones à partir de **cellules souches embryonnaires**. Ils ont pu augmenter la fraction de progéniteurs exprimant la cycline-D2 (ils deviennent équivalents à des progéniteurs basaux) en inhibant *prkc*, une kinase de type C. Cette augmentation de l'expression de la cycline-D2 s'est accompagnée d'une augmentation des divisions symétriques et d'une augmentation de la production d'interneurones à parvalbumine. En parallèle, ils ont pu augmenter le nombre de cellules qui sortent du cycle cellulaire en inhibant la voie notch, ce qui a entraîné une augmentation du nombre d'interneurones à somatostatine¹²⁹.

L'ensemble de ces résultats suggère qu'aux premiers stades embryonnaires suivant la fermeture du tube neural (E10-E12), les divisions asymétriques qui ont lieu dans la zone ventriculaire génèrent principalement des interneurones à somatostatine, et que les interneurones à parvalbumine sont principalement produits par les divisions symétriques des progéniteurs intermédiaires de la zone sous-ventriculaire, qui sont générés plus tardivement (E13-E15)⁴⁴ (**Figure 5**). On notera qu'une étude montre que la voie de signalisation wnt,

mise en jeu par les **β -caténines** (*ctnnb*), ainsi que la voie slit (*slit1* et *slit2*)/robo (*robo1*), interviennent dans le contrôle de la prolifération cellulaire dans la MGE¹³⁰⁻¹³².

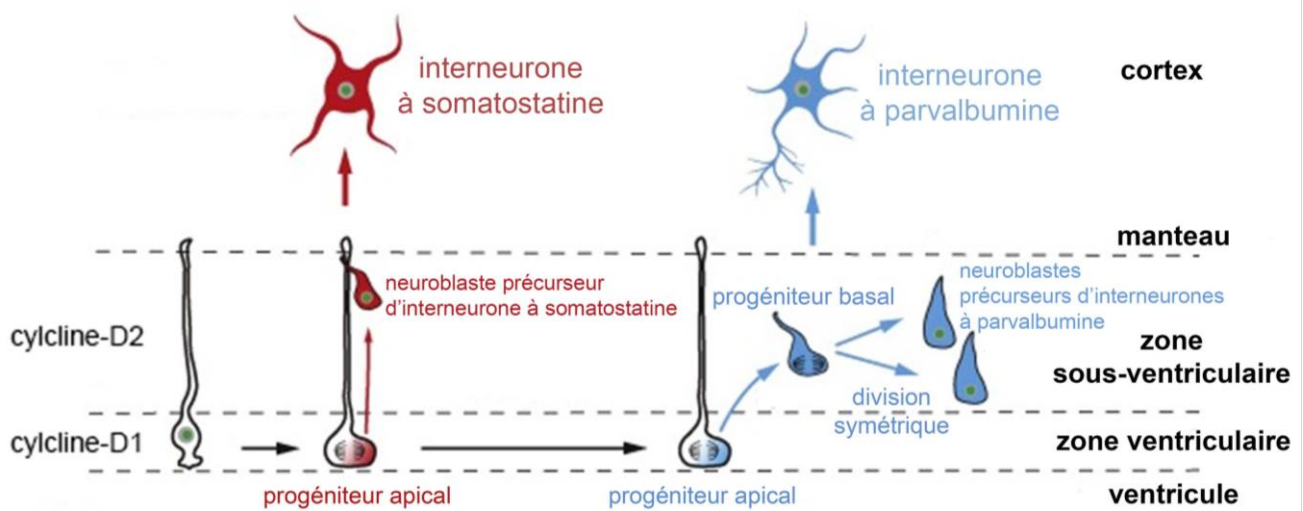


Figure 5 Prolifération dans les zones prolifératives de la MGE et production des interneurones synthétisant la parvalbumine ou la somatostatine chez la souris. Les progéniteurs apicaux (synthétisant la cycline-D1) produisent principalement des précurseurs d'interneurones à somatostatine par division asymétrique, puis des progéniteurs basaux (synthétisant la cycline-D2) qui produisent principalement des précurseurs d'interneurones à parvalbumine par division symétrique. Adapté de Bandler *et al.*, 2016⁴⁴.

Des études transcriptomiques ont mesuré l'expression génique différentielle entre la zone ventriculaire, la zone sous-ventriculaire et **le manteau** (région au cœur de la protubérance) de la MGE. Les cellules des zones prolifératives expriment principalement des gènes impliqués dans le cycle cellulaire (par exemple *Mybl2* et *Pcna*, impliqués dans la réplication, *cycline-A2*, *Cdc73*, *E2f1*, et *cycline-D1*, impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire ainsi que des gènes codants pour des facteurs de transcription que je décrirai dans la **Partie IC**). Notons que la sérine/théonine kinase MTOR régule la prolifération cellulaire et qu'en son absence, le nombre de cellules en autophagie augmente¹³³. Dès leur sortie du cycle cellulaire, en quittant la zone sous-ventriculaire pour le manteau, les neuroblastes commencent à se différencier, en synthétisant du GABA (je les nommerai pour cette raison **neuroblastes GABAergiques** à partir de ce point) et en exprimant des facteurs de transcription à boîte homéotique (*Arx*, *Lhx6*, *Dlx1*, *Dlx2*, *Dlx5*, *Dlx6*), ainsi que le gène impliqué dans la survie cellulaire *Gemin2*. Ces neuroblastes GABAergiques synthétisent

dans le manteau de la MGE des facteurs de transcription nécessaires à l'acquisition de l'identité « parvalbumine » ou « somatostatine » (*Sox6*, *Satb1*^{13,59,134,135}, **Figure 3**). Les neuroblastes expriment ensuite des gènes impliqués dans la migration cellulaire et la projection axonale, en particulier ceux codant pour la plexine-A2, la kinésine kif5a, les sémaphorines, les neurégulines, le récepteur du GDNF GFR α 1¹³⁶. Une étude similaire a été faite sur des cellules isolées (progéniteurs et neuroblastes dans la MGE). Il est apparu une grande homogénéité parmi la soixantaine de cellules prises en compte (entre E11,5 et E15,5), suggérant qu'il n'existerait pas de sous-populations de neuroblastes GABAergiques au sein de la MGE, et donc de différents lignages d'interneurones. Cependant, les auteurs soulignent que le faible nombre de cellules étudiées ne permet pas de conclusion fiable. Par ailleurs, il est possible que les ARNm spécifiques d'hypothétiques sous-populations de neuroblastes ne soient pas présents en quantité suffisante pour être détectés (seuls les 100 premiers gènes les plus exprimés ont été pris en compte), ou que la spécificité d'une sous-population fasse intervenir des mécanismes post-transcriptionnels. Ces études devront donc être poursuivies en considérant davantage de cellules, de gènes, et de stades développementaux¹³⁷. Cela pourra être fait par exemple en mesurant la quantité d'ARNm dans des cellules fluorescentes triées et marquées avec du bromodésoxyuridine (BrdU), un nucléoside synthétique analogue de la thymidine qui permet de dater la naissance des interneurones, à plusieurs stades donnés¹³⁸.

Le contrôle du cycle cellulaire dans les progéniteurs de la MGE, et plus particulièrement dans ceux des zones ventriculaire et sous-ventriculaire, intervient donc dans l'acquisition d'une identité d'interneurones à parvalbumine ou à somatostatine. A la sortie du manteau de la MGE, les neuroblastes sont GABAergiques (ils synthétisent du GABA), vraisemblablement déterminés à devenir interneurones à parvalbumine ou à somatostatine, et débutent leur migration.

B. Modalités temporelles dans les couches prolifératives et lignages d'interneurones à parvalbumine et à somatostatine

Nous avons vu l'existence d'un biais temporel de naissance des interneurones en faveur de ceux à somatostatine pour les stades de développement précoces et de ceux à parvalbumine pour les stades de développement tardifs. Ce biais a été confirmé par des expériences d'injection de BrdU. Des cellules de la MGE en phase S ont été marquées entre E13,5 et E15,5. Elles ont ensuite été transplantées dans un néocortex non marqué afin d'étudier leur devenir jusqu'à P30. Alors qu'une proportion équivalente d'interneurones à somatostatine et à parvalbumine marqués au BrdU a été observée après une injection à E13,5, des interneurones à parvalbumine marqués au BrdU ont principalement été observés après une injection à E15,5^{68,77}.

En comparant la morphologie des interneurones à parvalbumine marqués provenant d'injections à E13,5 et E15,5, les interneurones en chandelier étaient de loin plus représentés dans les souris injectées à E15,5^{68,77}. Ce résultat a depuis été confirmé. Après induction par injection de tamoxifènes à E17,5 de la protéine recombinase creER dans les cellules exprimant *Nkx2.1* et d'un rapporteur conditionnel, les neurones exprimant le rapporteur à P28 étaient des interneurones à parvalbumine en chandelier¹³⁹. Dans la même étude, des greffes hétérochroniques de cellules de la zone ventriculaire de la MGE exprimant *Nkx2.1* à E16,5 sur des tranches de cortex somatosensoriel à P3 ont montré que ces cellules deviennent des interneurones en chandelier, révélant l'existence d'un programme génétique à l'origine de cette différenciation¹³⁹.

De plus, tout comme les neurones glutamatergiques, les interneurones nés en premier dans la MGE occupent les couches néocorticales les plus profondes et les interneurones nés plus tardivement dans la MGE les couches néocorticales superficielles^{140,141}. Les cellules issues de **greffes isochroniques** de MGE marquées, à E12,5 et E15,5, dans des embryons hôtes non marqués, ont révélé que les cellules greffées au stade E12,5 occupent après la

naissance de manière préférentielle les couches néocorticales inférieures (en particulier la couche V) et que les cellules greffées à E15,5 occupent préférentiellement les couches néocorticales supérieures (les couches II et III). Les cellules issues de **greffes hétérochroniques** à E15,5 dans un embryon E12,5 occupent après la naissance préférentiellement les couches néocorticales inférieures au lieu d'occuper les couches néocorticales supérieures. C'est le cas également pour les cellules marquées par du BrdU au moment de la greffe (les progéniteurs). A E12,5, les progéniteurs et les neuroblastes sont donc sensibles à des signaux de l'environnement local qui leur confèrent une « **identité de couche néocorticale inférieure** ». Les cellules issues de **greffes hétérochroniques** à E12,5 dans un embryon E15,5 occupent après la naissance préférentiellement les couches néocorticales médianes, au lieu d'occuper les couches néocorticales inférieures. Ce n'est pas le cas pour les cellules marquées par du BrdU au moment de la greffe (les progéniteurs), qui occupent les couches néocorticales supérieures. A E15,5 les progéniteurs sont toujours sensibles aux signaux de l'environnement local qui leur confèrent une « **identité de couche néocorticale supérieure** » mais pas les neuroblastes qui ont déjà acquis en partie leur identité. Si on extrapole ces résultats, les cellules issues des progéniteurs à E13,5-E14,5 et les neuroblastes présents dans la MGE à E13,5-E15,5 occupent préférentiellement la couche néocorticale IV.

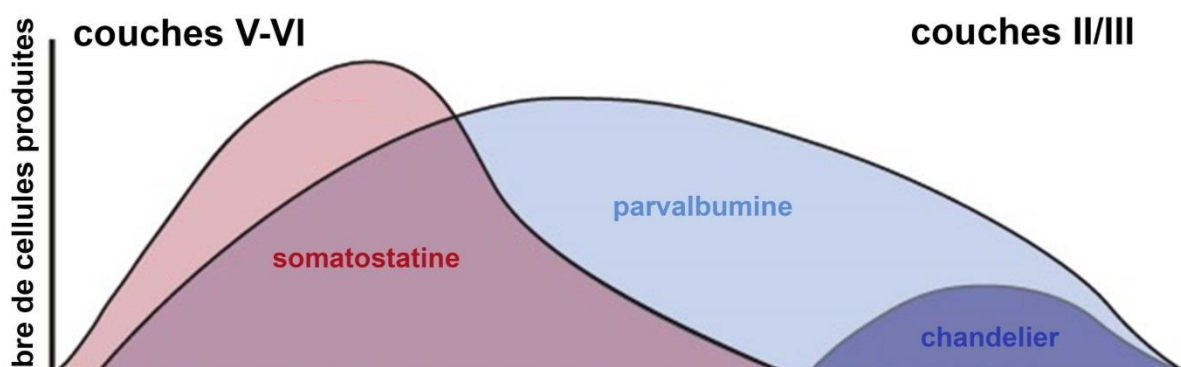


Figure 6 Modalités temporelles de la prolifération cellulaire dans la MGE. Les interneurones à somatostatine sont les premiers à être produits, avant les interneurones à parvalbumine. Les interneurones en chandelier sont produits en dernier. De plus, les interneurones nés en premier vont dans les couches néocorticales inférieures, ceux nés en dernier dans les couches néocorticales supérieures. Adapté de Bandler *et al.*, 2016⁴⁴.

Ainsi, les interneurones à somatostatine sont les premiers à être générés, puis viennent ceux à parvalbumine, et enfin ceux à parvalbumine en chandelier. De plus, les interneurones nés aux stades développementaux précoces s'intègrent dans les couches néocorticales inférieures, et ceux nés plus tardivement dans les couches néocorticales supérieures (Figure 6).

C. Modalités spatiales dans les zones prolifératives et lignages d'interneurones à parvalbumine et à somatostatine

La plupart des études qui ont porté sur les modalités temporelles impliquées dans l'établissement des lignages d'interneurones à parvalbumine et à somatostatine ont également porté sur l'existence de modalités spatiales. Dans les études mentionnées ci-dessus, les parties dorsale et ventrale de la MGE étaient dissociées avant transplantation. En plus du stade de développement, la sous-région d'origine des cellules transplantées au sein de la MGE était donc prise en considération. Les résultats ont montré qu'il existe un gradient dorso-ventral : les cellules marquées provenant de la MGE dorsale (**dmGE**) deviennent préférentiellement des interneurones à somatostatine (le rapport somatostatine/parvalbumine à partir de cellules à E13,5 est d'environ 1,5) et celles provenant de la MGE ventrale (**vmGE**) préférentiellement des interneurones à parvalbumine (le rapport parvalbumine/somatostatine à partir de cellules à E13,5 est entre 3 et 5)^{68,77,142}.

Afin de préciser les programmes génétiques qui pourraient être à l'origine de ce gradient dorso-ventral, une étude a cartographié l'expression de dix facteurs de transcription connus comme étant exprimés dans les éminences ganglionnaires entre E11,5 et E13,5. Cette carte reste constante entre E11,5 et E13,5 puis s'estompe. *Nkx2.1*, *Dlx2* ainsi que *Gsx2* (en faible quantité) sont exprimés dans toute la MGE (manteau inclus). L'observation de l'étendue de la zone exprimant *Nkx2.1* a permis d'insérer dans la MGE une région qui avait été attribuée auparavant à la CGE (notée MGE₃). On notera que *nkx2.1* est

un régulateur transcriptionnel majeur dans la MGE, en contrôlant par exemple l'expression de gènes impliqués dans la neurogenèse, de gènes codant pour des canaux ioniques liant des neurotransmetteurs, de gènes impliqués dans la différenciation neuronale, la migration cellulaire et la synaptogenèse, et l'adhérence cellulaire. Les gènes les plus exprimés sous le contrôle de *nkx2.1* sont *Lhx6*, *Lhx8*, *neuropeptide Y*, *Gsx2*, *Adamts5* codant pour une métalloprotéinase à motif thrombospondine, *brevican* codant pour une lectine, *Gsx1*, *Gpr17* et *Tgfb3* codant pour deux récepteurs. Les gènes les plus inhibés sous le contrôle de *nkx2.1* sont *retinaldehyde dehydrogenase 3*, *Dbx1* codant pour une protéine à boîte homéotique et *Nkx2.9*¹⁰⁶. Le rôle de certains de ces gènes n'est pas encore connu dans la MGE.

L'étude cartographique de la MGE a permis d'identifier au moins cinq sous-régions (notées MGE₁ à MGE₅) : leurs limites sont définies par un gradient dorso-ventral décroissant de l'expression de *Nkx6.2* de la MGE₁ à la MGE₂, un gradient dorso-ventral décroissant de *Nr2f1* (*Couptf1*) de la MGE₁ à la MGE₄, l'expression de *Lhx6* de la MGE₂ à la MGE₄, l'expression de *Lhx7* de la MGE₄ à la MGE₅, et l'expression de *Etv1* (*Er81*) dans la MGE₅. Lesquelles de ces sous-régions donnent préférentiellement des interneurones à parvalbumine ou à somatostatine ? Pour répondre à cette question, des greffes *in utero* isochroniques à E13,5 ont été réalisées à partir de la MGE₁ et la MGE₄ marquées. Elles ont donné un rapport (nombre d'interneurones à somatostatine) / (nombre d'interneurones à parvalbumine) de 1,5 pour la MGE₁ et de 0,33 pour la MGE₄. En extrapolant ces résultats, la dMGE serait composée des MGE₁ et MGE₂ (territoire d'expression de *Nkx6.2* et *Nr2f1*¹⁴³, ainsi que *Gli1*, *Hhip1*, et *Ptch1*¹⁴⁴), la vMGE serait composée des MGE₄ et MGE₅ (territoire d'expression de *Lhx7* et *Etv1*). La MGE₃ correspondrait à une MGE médiale¹⁴⁵ (**Figure 7**).

Ces résultats ne permettent cependant pas de conclure si ces facteurs de transcription exprimés de manière différentielle dans la dMGE et la vMGE sont directement impliqués dans l'établissement des deux lignages somatostatine et parvalbumine (d'autant plus que deux lignages peuvent utiliser des amplificateurs – *enhancers* – différents pour des mêmes gènes exprimés, ce qui a été montré pour les gènes *Dlx1* et *Dlx2*^{108,146}). Deux de ces facteurs de transcription, *nr2f1* et *nkx6.2*, semblent participer au biais spatial dans la MGE en

faveur de la production d'interneurones à somatostatine dans la dMGE. En effet, la délétion conditionnelle de *Nr2f1* sous le contrôle du promoteur de *Dlx5* et *Dlx6* (soit dans la zone sous-ventriculaire mais pas la zone ventriculaire, dès E12,5) n'entraîne pas de changement de la proportion d'interneurones à somatostatine dans le cortex somatosensoriel à P21 mais une augmentation de la proportion des interneurones à parvalbumine¹⁴³. Ce résultat conforte l'idée que les interneurones à somatostatine sont surtout générés dans la zone ventriculaire de la dMGE, que les interneurones à parvalbumine sont en partie générés dans la zone sous-ventriculaire de la dMGE et que *Nr2f1* y inhibe la production de ces derniers. Pour tester cette hypothèse, des expériences d'injection de BrdU et des comptages du nombre cellules en division ont révélé qu'il y a plus de cellules en division dans la zone sous-ventriculaire de la dMGE en l'absence d'expression de *Nr2f1*¹⁴³. De même, une étude montre que les cellules exprimant *Nkx6.2* donnent préférentiellement des interneurones à somatostatine (à E10,5 des interneurones à somatostatine seulement et à E12,5 des interneurones à somatostatine/calbindine-2) et que l'absence d'expression de *Nkx6.2* entraîne une diminution du nombre d'interneurones à somatostatine/calbindine-2⁷⁸. Notons que ces résultats indiquent que la région dorsale de la dMGE (exprimant *Nkx6.2*) produit les interneurones à somatostatine et à calbindine-2.

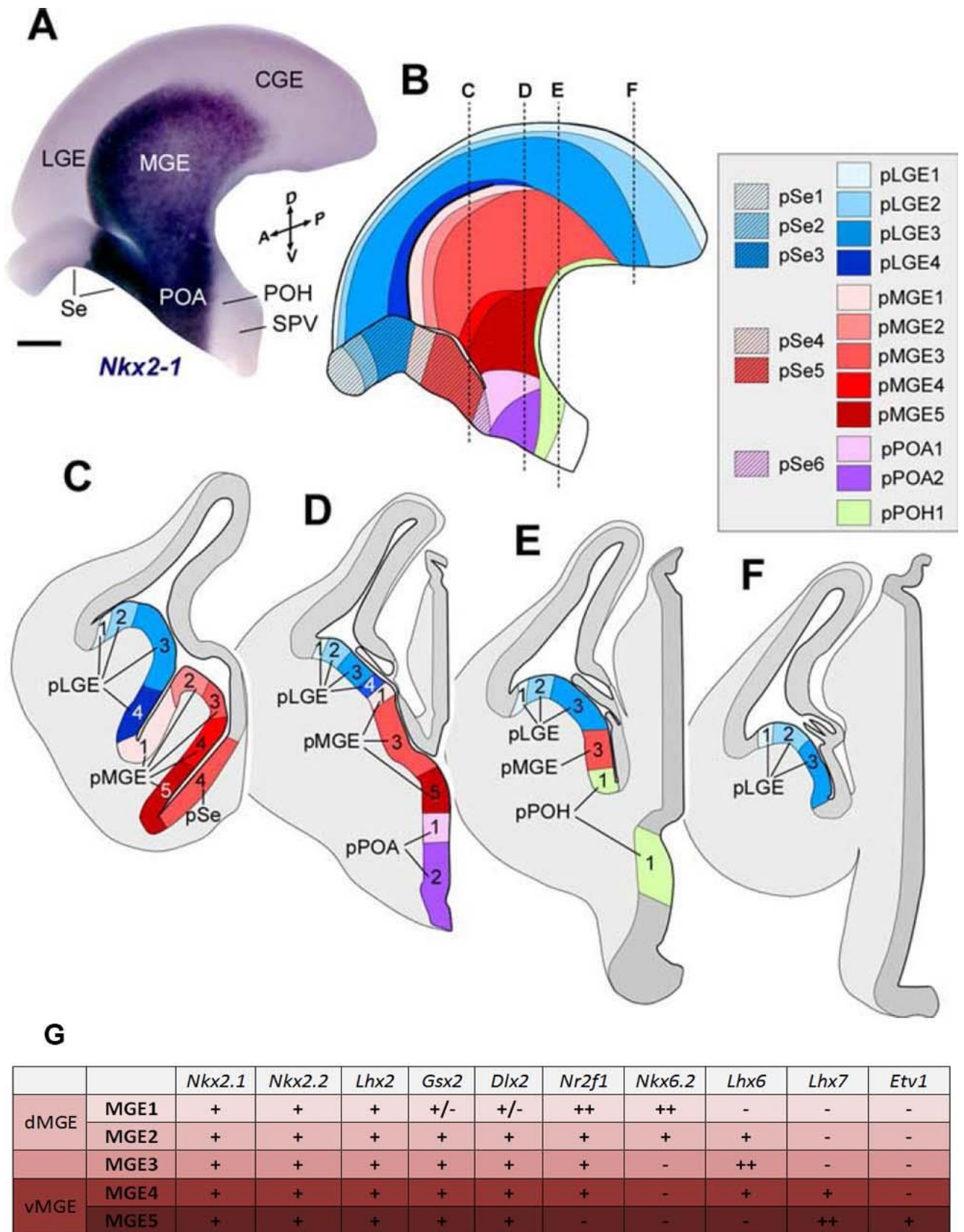


Figure 7 Sous-domaines dans les zones prolifératives des éminences ganglionnaires chez la souris. L'étude cartographique de l'expression de facteurs de transcription a permis d'établir 18 sous-domaines dans les zones prolifératives (p) des éminences ganglionnaires, dont 5 dans la MGE. MGE₁ et MGE₂ constituent la MGE dorsale (dMGE) qui donne préférentiellement des interneurons à somatostatine. MGE₄ et MGE₅ constituent la MGE ventrale (vMGE) qui donne préférentiellement des interneurons à parvalbumine. MGE₃ avait auparavant été considérée comme étant de la CGE. **A**, Subpallium *in toto* révélant l'expression de *Nkx2.1*. **B**, Schéma des régions prolifératives dans le subpallium (LGE en bleu, MGE en rouge, aire préoptique (POA) en violet, septum (SE) hachuré, aire préoptique de l'hypothalamus (POH) en vert. **C-F**, Schémas de quatre coupes selon l'axe antéro-postérieur décrivant la localisation des 18 sous-domaines. **G**, Facteurs de transcription pris en compte et expression relatives dans les sous-domaines de la MGE. Barre d'échelle : 200 µm. Issu de Flames *et al.*, 2007¹⁴⁵.

L'origine de ce gradient dorso-ventral pourrait être due au morphogène ventralisant shh. Dans le subpallium, *Nkx2.1* commence à s'exprimer avant *Shh*¹⁴⁷, mais l'expression de *Shh* est nécessaire pour maintenir une identité ventrale par rapport au pallium¹⁴⁸ (indépendamment d'une inhibition de *gli3*¹⁴⁹). En effet, l'absence d'expression de *Shh* induit une diminution de l'expression de *Nkx2.1*¹⁵⁰ ainsi que de *Nkx6.2*¹⁵¹ dans la MGE et une réduction du nombre d'interneurones à parvalbumine et à somatostatine¹⁵⁰. Afin de regarder si shh intervient dans les gradients observés dans la dMGE et la vMGE, *Smo*, un gène codant pour un récepteur à shh, a été invalidé de manière mosaïque dans les progéniteurs de la MGE dès E10,5, afin de regarder les effets de shh de manière « cellule autonome » et « cellule non autonome ». En effet, *smo* peut jouer un rôle **intrinsèque (effet « cellule autonome »)** dans les cellules ou **extrinsèque** en détectant shh (**effet « cellule non-autonome »**). Il s'en est suivi une diminution du nombre d'interneurones à parvalbumine et un nombre normal d'interneurones à somatostatine. Cela résultait d'une diminution du nombre d'interneurones à somatostatine qui ont été invalidés pour *Smo* et d'une augmentation du nombre d'interneurones à somatostatine non invalidés pour *Smo*. Pour confirmer que shh induit bien une identité dMGE et une production d'interneurones à somatostatine, des tranches de télencéphale marqué à E11,5 ont été incubées avec un ligand de shh (pour augmenter leur réponse à shh), puis la vMGE (produisant normalement principalement des interneurones à parvalbumine) a été greffée dans des embryons non marqués. Il s'en est suivi une augmentation d'un facteur 2 de la proportion d'interneurones marqués et exprimant la somatostatine.

Cette intervention de shh dans la mise en place d'un gradient dorso-ventral décroissant en faveur des interneurones à somatostatine est surprenante, shh étant plutôt un facteur ventralisant. Une autre preuve de la sécrétion de shh par les neuroblastes dans le manteau de la MGE a été apportée par l'étude de mutants doubles homozygotes pour *Lhx6* et *Lhx8*, gènes qui sont coexprimés dans la MGE des embryons sauvages. Chez ces doubles mutants, shh est toujours fortement synthétisé dans l'aire préoptique et dans une moindre mesure dans la zone ventriculaire de la MGE mais pas dans

le manteau de la MGE. En parallèle, *nkx2.1* est moins exprimé dans la dMGE de ces mutants. Ainsi, les neuroblastes exprimant *lhx6* et *lhx8* produiraient *shh* qui promeut l'expression de *nkx2.1* ainsi que de *ptc1* et *nkx6.2*¹⁵⁰ dans la dMGE. Les mutants simples et doubles homozygotes pour *Lhx6* et *Lhx8* présentent à E14,5 une réduction de l'expression de *Gli1* et *Nkx6.2* dans la zone ventriculaire, et de *Lmo3* et *Nkx2.1* dans la zone sous-ventriculaire. Cela a pour conséquence une réduction du nombre de neurones néocorticaux qui expriment à E18,5 *Arx*, *Calbindine-1*, *Gad1/Gad67*, *Npas1*, *Sst* et *Sox6*. Afin de distinguer les effets « cellule autonome » (perte de l'expression de *lhx6*) des effets « cellule non autonome » (perte de la sécrétion de *shh* dans l'environnement local), *Shh* a été invalidé uniquement dans la zone sous-ventriculaire et le manteau de la MGE (expression de la recombinaison *cre* sous le contrôle du promoteur de *Dlx1* et *Dlx2*). Chez ces souris, *Gli1*, *Ptc1* et *Nkx6.2* sont sous-exprimés dans la zone ventriculaire et la zone sous-ventriculaire de la dMGE, ce qui confirme que **les neuroblastes, en sécrétant *shh*, contrôlent l'identité des progéniteurs de la zone ventriculaire**. En l'absence d'expression de *Shh* dans la zone sous-ventriculaire de la MGE, les souris présentent à P24 une diminution du nombre d'interneurones à parvalbumine et à somatostatine de manière similaire, preuve que *lhx6* et *lhx8* agissent directement sur la transcription de *Shh*¹⁵².

Parallèlement à *shh*, le morphogène dorsalisant BMP4 participerait aussi à ce biais spatial : *in vivo*, la surexpression de BMP4 entraîne une augmentation de 70% des interneurones à parvalbumine. BMP4 semble jouer un rôle sur les progéniteurs car *in vitro*, son ajout dans des cultures de progéniteurs tardifs augmente la proportion d'interneurones à parvalbumine en défaveur des interneurones à somatostatine. BMP4 semble jouer aussi un rôle sur les neuroblastes dans le néocortex car son ajout à des cultures de neuroblastes issus du néocortex à P0 diminue la proportion d'interneurones à somatostatine et augmente la proportion d'interneurones à parvalbumine. Ce dernier résultat est intrigant car il pose la question, soit de la possibilité pour un précurseur d'interneurones de passer aux stades postnatals précoce d'un type à l'autre (ce point n'a pas reçu de validation expérimentale et a

été peu étudié pour l'instant), soit d'une intégration différentielle de ces précurseurs dépendante de BMP4¹⁵³.

En plus de shh, les sémaphorines-3a et -3f (sema3a et sema3f) sont exprimées dans la MGE¹⁵⁴. Les sémaphorines sont des protéines associées aux membranes et sécrétées. Elles jouent des rôles variés au cours du développement cérébral, du guidage axonal à la spécificité synaptique en passant par la polarité neuronale. Elles agissent via des complexes de récepteurs qui contiennent des plexines (en ce qui concerne les sémaphorines de classe 3, la **plexine-A1**, *plxna1*) de manière homomérique ou hétérodimérique. Les sémaphorines de classe 3 peuvent aussi se lier à des neuropilines, notamment la **neuropiline-1 (nrp1)**. Ces complexes de récepteurs sont en amont de voies activant des protéines kinases, des GTPases et des protéines associées au cytosquelette. Il a été montré que les sémaphorines peuvent aussi agir comme récepteurs des plexines¹⁵⁵. A E18,5, le nombre de neuroblastes GABAergiques est réduit dans le néocortex d'embryons mutants homozygotes pour *Sema3a* mais pas pour *Sema3f*. Une raison qui pourrait expliquer cette diminution est une réduction du nombre de progéniteurs dans la zone ventriculaire et la zone sous-ventriculaire à E14,5 chez les embryons mutants homozygotes pour *Sema3a*. Une réduction similaire est observée chez les embryons mutants homozygotes pour *Nrp1* et *Plxna1*¹⁵⁶, codants pour deux effecteurs de la voie sémaphorine, ce qui suggère, sans preuve formelle, que les progéniteurs portent *nrp1* et/ou *plxna1*, les rendant sensibles aux sémaphorines¹⁵⁴.

En conclusion, la dMGE produit préférentiellement les interneurones à somatostatine, dont les interneurones à somatostatine/calbindine-2 dans sa partie dorsale, alors que la vMGE produit préférentiellement les interneurones à parvalbumine. Ce biais spatial est permis par la production de shh par les neuroblastes GABAergiques de la MGE qui participent à l'établissement d'un gradient dorso-ventral décroissant de shh.

D. Etudes clonales et lignages d'interneurones spécifiques de régions néocorticales

Nous avons vu que la couche néocorticale préférentielle occupée par un interneurone est prédéterminée en fonction de son stade développemental de naissance. Se pose cependant la question d'une possible prédétermination de l'aire néocorticale de destination de lignages interneurones. Pour répondre à cette question, cinq études ont été publiées depuis 2011 par les groupes de Song-Hai Shi (Weill Cornell Medical College, New York, Etats-Unis)^{157,158}, Oscar Marín (Institut de Neurosciences de Sant Joan d'Alacant, Espagne)¹⁵⁹, Gord Fishell (Institut de Neurosciences de New York, Etats-Unis)^{160,161} et Arnold Krigstein (Université de San Francisco, Etats-Unis)¹⁶², avec des conclusions en partie contradictoires.

Les deux premières études, de Keith Brown *et al.* en 2011 (dans le laboratoire de Song-Hai Shi)¹⁵⁷ et de Gabriele Ciceri *et al.* en 2013 (dans le laboratoire d'Oscar Marín)¹⁵⁹, ont consisté à marquer des progéniteurs en division dans la zone ventriculaire de la MGE afin de marquer les lignages cellulaires qui en sont issus^{72,163} (**Figure 8**). Brown *et al.* ont produit une lignée de souris dans laquelle les interneurones issus de la MGE expriment la β -galactosidase et le récepteur TVA apparenté au rétrovirus du sarcome de la leucose aviaire de groupe A (souris *Nkx2.1-cre;LSL-RS26^{TVAiLacZ}*). En injectant à E11-E12 le rétrovirus, à faible titre, exprimant la protéine fluorescente verte EGFP ou la protéine fluorescente rouge mCherry dans la MGE des embryons de cette lignée, Brown *et al.* ont ainsi pu marquer quelques progéniteurs précoces de la MGE. De manière semblable, Ciceri *et al.* ont injecté à E11,5 un rétrovirus à faible titre portant une séquence floxée du gène codant pour la protéine fluorescente verte GFP ou la protéine fluorescente rouge mCherry dans des embryons exprimant la recombinaison cre dans les interneurones issus de la MGE (souris *Nkx2.1-cre*). L'injection des rétrovirus à faible titre est nécessaire pour marquer un faible nombre de progéniteurs et de lignages (marquage clonal). **Dans ces deux études, des interneurones**

de même origine clonale issus de progéniteurs précoces de la MGE expriment une protéine fluorescente (EGFP ou GFP et mCherry).

Brown *et al.* ont tout d'abord vérifié qu'ils avaient bien marqué des cellules de même origine clonale : 24 heures après l'injection, un progéniteur (avec un long processus basal) était marqué plus une cellule multipolaire avec un processus court ; de 48 à 72 heures après l'injection, un seul progéniteur était toujours marqué ainsi que deux à trois cellules (quatre à cinq à 72 heures) orientées radialement le long du processus basal du progéniteur. A P7 et P21, Brown *et al.* ont étudié la distribution des interneurones synthétisant la même protéine fluorescente. Ils ont comparé la distribution de ces interneurones de même origine clonale à une distribution aléatoire, en mesurant la distance de chaque interneurone à son plus proche voisin. **Les interneurones de même origine clonale n'étaient pas distribués de manière aléatoire mais étaient regroupés (forment des groupes) dans des régions distinctes pour 40 à 50% d'entre eux (formaient des *clusters*).** Par exemple, le long de l'axe antéro-postérieur, des interneurones de même origine clonale étaient confinés dans trois coupes coronales successives (70 μm d'épaisseur chacune) ou dans une même colonne néocorticale. Les interneurones EGFP et mCherry n'étaient pas retrouvés au sein des mêmes groupes, ce qui suggère que des interneurones d'origine clonale différente ne formeraient pas de groupes entre eux. Les groupes d'interneurones étaient éloignés entre eux de plus de 500 μm (soit une distance supérieure à l'épaisseur d'une colonne néocorticale). Par ailleurs, 25% des groupes d'interneurones ne synthétisaient que la parvalbumine ou que la somatostatine alors que 75% des groupes synthétisaient les deux, confortant l'idée que les progéniteurs apicaux à E12 synthétisant des interneurones à somatostatine donnent ensuite des progéniteurs capables de produire la parvalbumine.

Ciceri *et al.* ont également vérifié qu'ils avaient bien marqués des cellules de même origine clonale en regardant les cellules marquées à E13,5. **Tout comme dans la précédente étude, la distribution des interneurones marqués n'est pas aléatoire.** Les groupes sont confinés dans des espaces de 0,03 mm^3 , soit dans des volumes équivalents à celui d'une colonne néocorticale. Contrairement à Brown *et al.*, Ciceri *et al.* ont observé à

P20 que 60% des groupes contiennent une protéine fluorescente dominante avec au moins un interneurone marqué pour l'autre protéine fluorescente, indiquant que **même si les interneurones de même origine clonale ont tendance à former des groupes, ces derniers comprennent aussi des interneurones d'origine non clonale**. Les interneurones qui se regroupaient étaient situés de manière préférentielle dans les couches néocorticales profondes (V-VI), ce qui est attendu pour des progéniteurs ayant été marqués à E12,5. Afin de déterminer le stade de naissance des interneurones, Ciceri *et al.* ont injecté du BrdU à E12,5 ou E15,5. Tous les interneurones de même origine clonale qui étaient localisés dans une seule couche provenaient de cellules injectées au même âge et tous ceux qui étaient distribués dans plusieurs couches d'une même colonne néocorticale provenaient de cellules injectées à des âges différents (50% d'entre eux étaient d'âge différent). Or 77% des groupes d'interneurones de même origine clonale regroupaient des interneurones de même âge, ce qui peut expliquer pourquoi les auteurs ont tout d'abord pensé à une localisation préférentielle des interneurones de même origine clonale dans les couches profondes. **Le résultat le plus surprenant est donc que des interneurones de même origine clonale nés à deux stades différents (E12,5 et E15,5) sont situés dans une même colonne néocorticale**. Les interneurones marqués étaient à 75% des interneurones à parvalbumine et la moitié des groupes ne contenaient que des interneurones à parvalbumine (très peu de groupes ne contenaient que des interneurones à somatostatine). En injectant le même rétrovirus dans d'autres lignées de souris (Pvalb-cre, Sst-cre, VIP-cre), Ciceri *et al.* ont pu préciser que les interneurones de même origine clonale de chaque sous-type d'interneurone (à parvalbumine, à somatostatine et à VIP) ne se distribuent pas de manière aléatoire dans le néocortex.

Un des biais expérimentaux des deux précédentes études est de considérer que deux interneurones marqués par la même protéine fluorescente soient des interneurones de même origine clonale (biais pris en compte en utilisant un faible titre). Deux autres études publiées en 2015, par Christian Mayer *et al.* (dans le laboratoire de Gord Fishell)¹⁶⁰ et par

Corey Harwell *et al.* (dans le laboratoire d'Arnold Kriegstein)¹⁶², ont ainsi injecté à E10,5-E12,5 (E12,5 pour la seconde étude), à faible titre, des rétrovirus (protocole proche de celui de Brown *et al.*, donc) exprimant des codes-barres d'ADN de 24 paires de base (ainsi que le gène codant pour la GFP liée à la membrane) : **ces études permettent en théorie de marquer jusqu'à 100 000 lignages et de déterminer avec quasi certitude si deux interneurones ont la même origine clonale.**

Mayer *et al.* ont procédé comme Brown *et al.* en ce qui concerne l'injection rétrovirale et l'étude des progéniteurs marqués quelques jours après l'injection, quoique l'injection ait été pendant une période développementale plus large et décalée dans des stades plus précoces (E10,5-E12,5 au lieu de E11-E12). 44% des codes-barres étaient exprimés à P16 dans un seul interneurone et 56% dans plusieurs interneurones (jusqu'à 6). Pour ces derniers, on peut donc véritablement parler d'interneurones de même origine clonale. **Les auteurs observent que 61% des interneurones issus de la MGE sont localisés dans le néocortex, 7% dans l'hippocampe, 3% dans le striatum ; et que ces différentes structures télencéphaliques peuvent avoir des interneurones de même origine clonale** (20% des interneurones de même origine clonale sont localisés dans le néocortex et l'hippocampe, 2 à 6% dans le néocortex et les ganglions de la base). Il a également été observé que les interneurones de même origine clonale n'occupent que les structures ipsilatérales de l'éminence injectée et n'occupent pas l'hypothalamus. En mesurant la distance de chacun des interneurones de même origine clonale à son plus proche voisin, Mayer *et al.* ont obtenu une distance moyenne de 1 885 µm dans le néocortex avec 8% des interneurones de même origine clonale pour lesquels cette distance est inférieure à 500 µm. En incluant les interneurones qui sont seuls à porter un code-barres, la distance moyenne entre deux interneurones de même origine clonale est plus grande qu'entre deux interneurones d'origine clonale différente. **Les auteurs de cette étude proposent donc de revoir à la baisse (8% contre 40-50%) le nombre d'interneurones de même origine clonale qui se regroupent dans le néocortex.**

Harwell *et al.* ont procédé de même, en injectant le rétrovirus à E12,5. Une différence observée par rapport à l'étude de Brown *et al.* est que 2 à 8 heures après l'injection, les cellules de même origine clonale ne sont pas regroupées entre elles autour du processus basal de leur progéniteur mais migrent dans des directions différentes, résultat indépendant de la question de leur destination. Comme l'étude précédente, 70% des codes-barres étaient exprimés à P28 dans un seul interneurone et 30% dans plusieurs interneurons (jusqu'à 6, en moyenne 2,8). Les auteurs obtiennent des proportions similaires pour la répartition des interneurons de même origine clonale entre le néocortex, l'hippocampe et le striatum. **Et comme l'étude précédente, la distance moyenne entre interneurons de même origine clonale est plus grande qu'entre deux interneurons d'origine clonale différente (750 μm contre 585 μm).**

Mayer *et al.* et Harwell *et al.* retrouvent entre 2% et 6% des code-barres dans plusieurs expériences indépendantes, alors que la probabilité qu'un même code-barres soit retrouvé dans deux expériences indépendantes est de 0,003% (vu le faible nombre d'interneurones de même origine clonale marqués)^{158,160,162}. Cette surreprésentation de code-barres pourrait être due à des contaminations dans la population de vecteurs injectés. Ils ont exclus de leurs études ces populations d'interneurones qui auraient pu entraîner un biais dans leurs résultats.

Un biais des deux précédentes études a été d'inclure dans les distributions les interneurons qui étaient seuls à porter un code-barres, et qui ne constituent donc pas des populations d'interneurones de même origine clonale. Khadeejah Sultan *et al.* (dans le laboratoire de Song-Hai Shi)¹⁵⁸ ont donc repris en 2016 le même protocole en corrigeant ce biais (ils ont exclus les interneurons qui sont seuls à porter un code-barres). Ils ont également exclus les populations dont le code-barres est retrouvé dans plusieurs expériences. Miguel Turrero Garcia *et al.* (dans le laboratoire de Corey Harwell)¹⁶⁴ et Christian Mayer *et al.* (dans le laboratoire de Gord Fishell)¹⁶¹ ont analysé à nouveau les données publiées l'année précédente.

Sultan *et al.* ont tout d'abord compté le nombre d'interneurones issus de la MGE en croisant des souris *Nkx2.1-cre* avec une souris rapporteuse (*Ai9-tdTomato*). **Ils ont compté près d'1 million d'interneurones dans le néocortex, 62 000 dans les ganglions de la base et 58 000 dans l'hippocampe**, ce qui rejoint quelque peu les proportions obtenues par Mayer *et al.* en 2015 (ici **89% dans le néocortex, 5,7% dans les ganglions de la base, 5,4% dans l'hippocampe**). Sultan *et al.* ont réalisé la même expérience que Mayer *et al.* et Harwell *et al.* en 2015 et ont aussi analysé leurs données. En regardant la distribution des interneurones de même origine clonale, ils observent, de manière similaire à Mayer *et al.* en 2015, que **74% des interneurones de même origine clonale ne vont que dans le néocortex, 0,2% dans l'hippocampe ou les ganglions de la base seulement et 25,8 qui vont dans au moins deux de ces structures (avec 1,1% dans les trois)**. En reprenant les données de Mayer *et al.* et Harwell *et al.* en 2015, ils ont exclu de la mesure de la distance moyenne entre deux interneurones de même origine clonale, les interneurones qui sont les seuls à avoir leur code-barres (qui ne représentent donc pas une population clonale) ainsi que ceux qui n'ont pas de code-barres du tout. Cette analyse, sur trois jeux de données donc, indique que la distance entre des interneurones de même origine clonale est plus courte qu'entre des interneurones d'origine clonale différente : **environ 50% des interneurones clonaux forment des groupes dans une structure du télencéphale et 60% des groupes d'interneurones sont entre des interneurones clonaux**. Plus précisément, ce dernier pourcentage est pour une distance maximum de 2 mm entre membres d'un groupe, il est d'environ 40% si la distance est d'environ 1,5 mm, d'environ 20% si elle est de 1 mm et de 8% pour une distance de 500 μm (ce qu'avaient indiqué Mayer *et al.* en 2015) (**Figure 8**).

Turrero Garcia *et al.* ont répondu à Sultan *et al.* en reprenant eux aussi les précédentes études. **Ils rappellent que toutes les études sont d'accord sur le point que les interneurones clonaux ne se distribuent pas de manière aléatoire dans le télencéphale** (70% d'entre eux vont dans une seule structure télencéphalique par exemple). Ils contestent cependant la définition de groupe utilisée dans l'étude de Sultan *et al.* : dans

cette dernière étude les interneurones étaient considérés comme formant un groupe s'ils étaient distants de 1,5 - 2 mm au maximum alors que Mayer *et al.* ainsi que Turrero Garcia *et al.* **considèrent comme biologiquement pertinent de ne considérer que les groupes distants de 500 μm au maximum (diamètre moyen d'une colonne néocorticale)**. De plus, les auteurs ne fondent pas leur analyse seulement sur la distance entre deux interneurones mais sur **le volume minimal d'un cube qui comprendrait deux interneurones de même origine clonale**. En prenant en compte ce paramètre, ce volume est entre 5 et 10 mm^3 dans les études de Harwell *et al.* et de Mayer *et al.* en 2015, d'environ 1 mm^3 dans l'étude de Sultan *et al.*, de 0,005 à 0,01 mm^3 dans les études de Brown *et al.* et Ciceri *et al.*

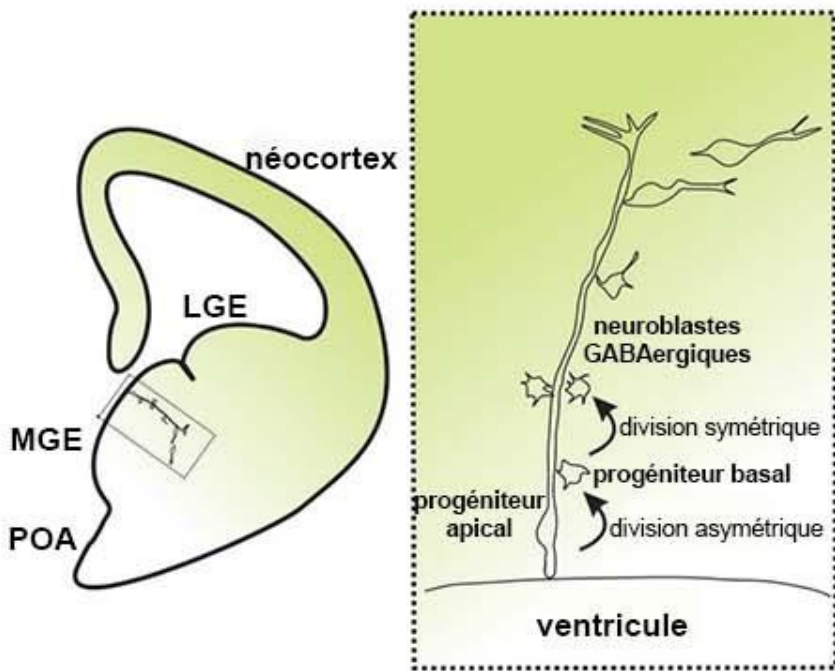
Mayer *et al.* ont également répondu à Sultan *et al.* : ils rappellent eux aussi que toutes les études montrent que les interneurones clonaux ne se distribuent pas de manière aléatoire dans le télencéphale. Ils contestent les modèles comparant cette distribution à une distribution aléatoire, préférant une comparaison de la plus proche distance entre interneurones de même origine clonale et entre interneurones d'origine clonale différente. Ils ont annulé le biais qui consistait à considérer les interneurones qui sont seuls à exprimer leur code-barres et n'ont pas mesuré de différence de distance entre interneurones de même origine clonale ou d'origine clonale différente. **Ils admettent cependant que 52% des interneurones de même origine clonale peuvent former des groupes et que 60% des groupes d'interneurones contiennent des interneurones de même origine clonale**. Ils mentionnent de plus un biais expérimental : le faible nombre de neurones infectés dans chaque expérience (de 10 à 300, soit environ 3 pour 10 000 du nombre total d'interneurones) peut donner une mauvaise estimation de ces proportions.

Que retenir de ce débat qui est loin d'être clos ? Tout d'abord, ces études clonales permettent d'étudier au sein de la MGE les modes de division et de suivre quelques heures après l'injection le comportement des cellules de même origine clonale. Ainsi, quasiment toutes ces études confirment la transition d'une division asymétrique des progéniteurs (donnant principalement des interneurones à somatostatine) vers une division symétrique (donnant principalement des interneurones à parvalbumine) et que les neuroblastes de même origine clonale sont alignés de manière radiaire dans la zone ventriculaire et la zone sous-ventriculaire le long du processus basal de leur progéniteur apical (seuls Harwell *et al.* ont obtenu des résultats différents). Ces études donnent aussi des éléments factuels : le nombre d'interneurones issus de la MGE et leur répartition dans le télencéphale (environ 1 millions d'interneurones, répartis à 89% dans le néocortex, à 5,7% dans les ganglions de la base et à 5,4% dans l'hippocampe) et que les interneurones d'une MGE ne migrent pas dans l'hypothalamus et dans le télencéphale contralatéral. Ces études clonales montrent aussi que 70% des interneurones de même origine clonale sont attribués à une seule structure télencéphalique, suggérant l'existence d'un code d'attribution à l'une de ces structures, et posant la question des 30% d'interneurones de même origine clonale qui vont dans plusieurs structures (partagent-ils un code ou vont-ils par défaut dans toutes les autres structures ?). Si les études ayant utilisé l'expression de code-barres ont permis véritablement d'étudier des populations clonales, le faible nombre d'interneurones infecté et le nombre probablement important de cellules qui inhibent leur expression virale ne permet cependant d'étudier qu'un nombre restreint de populations (une centaine dans chaque expérience), et de petites populations (6 interneurones au maximum par population clonale) : ce nombre devra être augmenté ou des marqueurs de populations clonales devront être trouvés. De plus, la surreprésentation de certains codes-barres entre différentes expériences indépendantes indique la nécessité de porter attention à la composition de la banque virale injectée.

En revanche, si le débat portait au début sur des questions liées à l'infection elle-même (utilisation de code-barres ou non), il porte maintenant sur ce qui est considéré comme un groupe d'interneurones. Si la présence au sein d'une colonne néocorticale est considérée comme pertinente, ces études sont d'accord pour dire qu'environ 8% des interneurones de même origine clonale forment des groupes dans des colonnes néocorticales (cf. Mayer *et al.* ainsi que Harwell *et al.*). Mais une aire néocorticale fonctionnelle (auditive par exemple) est plus large qu'une colonne corticale et considérer une distance de 2 mm voire un volume d'1 mm³ (Sultan *et al.*) peut être pertinent. Cela reviendrait à dire que 60% des interneurones d'une aire néocorticale fonctionnelle pourraient être de même origine clonale. Là encore, seule l'identification et l'utilisation de marqueurs de ces populations pourra permettre de répondre à cette question.

A

stade embryonnaire



stade postnatal

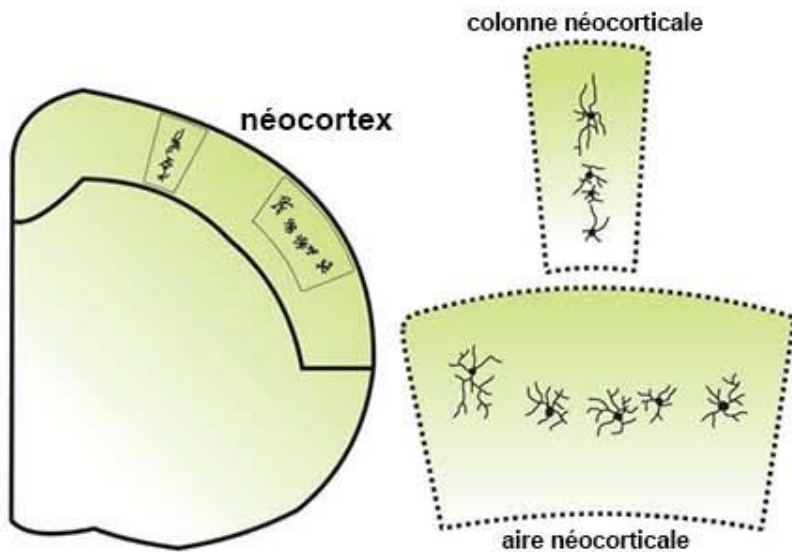
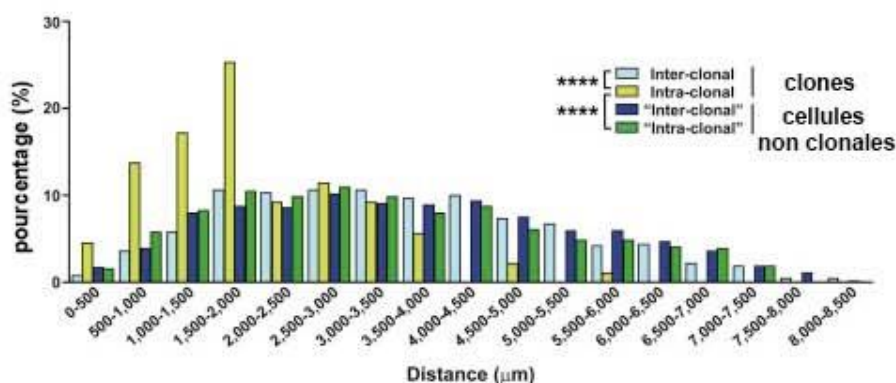
**B**

Figure 8 Destination des interneurons de même origine clonale chez la souris. **A**, Schémas représentant les expériences menées par Brown *et al.*, 2011¹⁵⁶ et Ciceri *et al.*, 2013¹⁵⁸. Un progéniteur est marqué dans la MGE, ainsi que les neuroblastes qui en sont issus (ils sont localisés au début le long du processus basal du progéniteur apical). Aux stades postnatals, les interneurons de même origine clonale se regroupent préférentiellement dans des colonnes ou des aires néocorticales restreintes. **B**, Histogramme représentant la distribution des groupes d'interneurones en fonction de la distance entre interneurons (à partir des données de Mayer *et al.*, 2015¹⁵⁹): les distances sont entre interneurons de même origine clonale (« intra-clonal ») ou d'origine différente (« inter-clonal »). En bleu et vert foncés, cette distribution selon l'analyse de Mayer *et al.*, 2015¹⁵⁹. En bleu et vert clairs, cette distribution après analyse de ces données par Sultan *et al.*, 2016¹⁵⁷. Cette analyse a exclus les interneurons qui étaient les seuls à exprimer leur code-barres (on ne pouvait pas parler de populations clonales à proprement parler). Il apparaît que si on considère une distance de 500 µm pertinente pour considérer que deux interneurons appartiennent à un même groupe, 8% des interneurons de même origine clonale forment des groupes. Ce chiffre monte à au moins 50% si on considère une distance de 2 mm. **A** adapté de Sultan *et al.*, 2013⁷² et **B** issu de Sultan *et al.*, 2016¹⁵⁸.

En conclusion, les zones ventriculaire et sous-ventriculaire de la MGE donnent naissance aux deux types d'interneurones cardinaux, ceux à parvalbumine et à somatostatine. Ces zones prolifératives comprennent plusieurs domaines distribués le long d'un axe dorso-ventral. Pour l'instant, seul un biais spatial a été identifié entre la dMGE, qui donne préférentiellement des interneurones à somatostatine à des stades précoces, et la vMGE qui donne préférentiellement des interneurones à parvalbumine à des stades plus tardifs. Les interneurones nés à des stades précoces occupent les couches néocorticales inférieures et les interneurones nés plus tardivement les couches néocorticales supérieures. L'existence d'un déterminisme dans la MGE de sous-types d'interneurone n'est pas connue (excepté pour les interneurones en chandelier qui sont générés en dernier) mais il semblerait que des interneurones de même origine clonale se regroupent dans des aires néocorticales restreintes. Les aspects génétiques et moléculaires de ces lignages restent à être élucidés. Quoiqu'il en soit, à la sortie de la MGE, les neuroblastes GABAergiques qui débutent leur longue migration vers le néocortex ont déjà commencé à se différencier.

II. Migration tangentielle des neuroblastes GABAergiques issus de la MGE chez la souris

Jusqu'à la fin des années 1990, on pensait que les interneurons corticaux naissent dans le cortex, comme les neurones glutamatergiques. Dès la fin des années 1980, des indices indiquaient cependant que le GABA commence à être synthétisé dans le subpallium avant d'être synthétisé dans le cortex¹⁶⁵ et que des neurones synthétisant le GABA migrent tangentiellement à la zone ventriculaire au sein du néocortex¹⁶⁶. Il était également connu que l'essentiel des neurones qui migrent tangentiellement à la zone sous-ventriculaire néocorticale provenaient de la LGE^{46,48}, sans que l'on sache s'ils naissaient dans la LGE ou y étaient en transit. De plus, on savait que les neurones glutamatergiques et GABAergiques constituent deux lignages cellulaires différents^{167,168}.

C'est à partir de 1997 que des études montrent que l'essentiel, puis la totalité, des interneurons naît dans le subpallium (MGE-CGE) puis migre tangentiellement à la zone ventriculaire vers le néocortex. Tout d'abord, il a été montré que des cellules migrent au cours du développement du subpallium vers le néocortex. Pour cela, des cristaux fluorescents rouges (Dil) ou de tungstène couplé à un marqueur fluorescent ont été introduits dans la LGE de tranches télencéphaliques. Les auteurs ont observé une migration des cellules marquées dans le néocortex tangente à la zone ventriculaire au bout de 36 heures. Ces neurones possédaient **un processus conducteur** ou **neurite** (en anglais, **leading process**) tangent à la zone ventriculaire néocorticale, un **lamellipode** (souvent appelé **cône de croissance** – en anglais, **growth cone** – étant donné sa ressemblance avec celui à l'extrémité des axones) et **un processus arrière** (en anglais, **trailing process**)^{47,61,169-171} (**Figure 11**). Ces expériences ont aussi pu préciser que la migration tangentielle commence vers E12,5. Lors de ces expériences, des immuno-marquages pour le GABA ou encore Ihx6 co-localisaient avec le Dil^{47,61,169}. De plus, si une lésion était faite à **la frontière entre le pallium et le subpallium** (parfois appelée frontière cortico-striatale), le nombre de cellules

GABAergiques dans le néocortex était diminué d'un facteur 10. En parallèle, les auteurs se sont interrogés sur le rôle de *Dlx1* et *Dlx2*. Il était en effet connu que ces gènes sont exprimés uniquement dans le subpallium avant E13,5, puis dans le néocortex à partir de ce stade. En cas de lésion à la frontière entre le pallium et le subpallium, le nombre de cellules exprimant *Dlx1* et *Dlx2* est fortement réduit dans le néocortex (-70%) et la migration tangentielle étudiée est fortement réduite chez les embryons mutants doubles homozygotes pour *Dlx1* et *Dlx2*⁴⁷.

Deux ans plus tard, une étude a précisé que la source majeure des interneurons dans le subpallium est la MGE. *In vitro*, les cellules issues de la MGE sont celles qui migrent le plus loin dans un gel de matrice extracellulaire (280 µm en 24 heures), par rapport à celles de la LGE (117 µm) ou d'autres structures cérébrales. Des explants marqués de LGE et MGE ont été greffés *in vivo* dans des cerveaux adultes. Alors que les neurones issus d'explants de LGE ou de néocortex migrent peu autour de leur lieu d'implantation, les neurones issus de greffes de MGE se propagent dans toutes les directions ; ces résultats comportent une exception : les neurones issus d'explants de LGE suivent la voie de migration rostrale, mais pas ceux issus d'explants de MGE. De plus, les neurones issus d'explants de MGE sont immuno-réactifs pour le GABA, indiquant qu'il s'agit d'interneurones. Des résultats similaires ont été obtenus *in utero*, où seuls les neurones en provenance d'explants de MGE vont vers le néocortex à E12,5 (à E14,5, c'est le cas pour la MGE et la CGE, alors identifiée comme la LGE^{57,63,64,69})¹⁶⁹. Ces résultats vont donc dans le sens de l'étude précédente, en précisant qu'en réalité les interneurons proviennent essentiellement de la MGE. Les neurones de la LGE marqués par le Dil était en fait des interneurons en transit depuis la MGE⁵⁸.

Les outils génétiques n'ont pas tardé à confirmer ce fait : *Nkx2.1* est exprimé au cours du développement uniquement dans la MGE et l'aire préoptique. Son inactivation entraîne une diminution du nombre d'interneurones et des neurones migrant tangentiellement d'au moins 40-50%^{60,169,172}.

Je décrirai dans cette partie les différents flux de migration tangentielle, les aspects temporels de cette migration ainsi que les structures anatomiques et les molécules impliquées dans cette migration.

A. Migration tangentielle au sein de deux principaux flux

Juste après leur naissance, les neuroblastes GABAergiques se situent le long du processus basal de leur progéniteur^{55,157,159,173}. Ils migrent ensuite à travers le subpallium, en évitant l'aire préoptique et le striatum (certains neurones issus de la MGE vont dans le striatum, mais les futurs interneurons néocorticaux n'y passent pas). Ils franchissent ensuite la frontière entre le pallium et le subpallium, que certains ont comparé au franchissement de la ligne médiale par les axones commissuraux. Cette entrée dans le néocortex constitue une nouvelle phase migratoire. La migration tangentielle peut donc être divisée en une première phase allant de la MGE à la frontière entre le pallium et le subpallium, puis d'une seconde phase de migration à travers le néocortex. Au cours de ces étapes, les neuroblastes GABAergiques parcourent une grande distance au cours de leur migration depuis le subpallium jusqu'aux aires corticales antérieures comparativement à la migration radiaire dans le néocortex des neuroblastes glutamatergiques. Ils migrent également plus rapidement : entre 50 et 80 $\mu\text{m}/\text{heure}$ pour les neuroblastes GABAergiques contre environ 19 $\mu\text{m}/\text{h}$ pour les neuroblastes glutamatergiques¹⁷⁴⁻¹⁷⁶.

C'est à partir de E12,5 que les premiers neuroblastes GABAergiques issus de la MGE commencent leur migration tangentielle, soit juste après leur naissance^{73,172,177}. Une fois dans le néocortex, ces premiers neuroblastes migrent au niveau du **pré-plateau** (en anglais, **preplate**), couche entre la zone ventriculaire et la pie-mère, qui deviendra par la suite la **plaque corticale** et le **sous-plateau** (en anglais, **subplate**). Rapidement, d'autres neuroblastes GABAergiques empruntent la **zone intermédiaire**, située entre le sous-plateau et la zone sous-ventriculaire^{172,177,178}. Entre E14 et E15, les neuroblastes migrent au sein de

deux principaux flux de migration tangentielle en évitant la plaque corticale : un flux dans la **zone marginale** qui correspond au **flux superficiel** (zone sous la pie-mère, et plus particulièrement sa partie inférieure, sous les cellules Cajal-Retzius¹⁷⁹), et un flux dans la zone intermédiaire/zone sous-ventriculaire qui correspond au **flux profond** (peu d'interneurones traversent en plus le sous-plateau). Le flux profond de migration concentre les trois quarts des neuroblastes GABAergiques en migration tangentielle (**Figure 9**, cf. **Figure 14** pour le développement de la plaque corticale)^{25,61,169,175,178}. Certaines études subdivisent le flux profond en deux autres flux : celui dans la zone intermédiaire et celui dans la zone ventriculaire/sous-ventriculaire¹⁰⁹. A E12-E13, les deux flux sont très proches (la plaque corticale est très fine) et le processus conducteur des neuroblastes GABAergiques du flux profond touche la zone marginale ; certains neuroblastes GABAergiques peuvent même passer dans le flux superficiel^{54,180-182}. Environ 70% des neuroblastes GABAergiques du flux profond plongent dans la zone ventriculaire/zone sous-ventriculaire néocorticale, y reste quelques temps à l'état stationnaire puis migrent radialement vers la plaque corticale (**Partie III**). A ce moment-là, leur migration tangentielle est par définition terminée¹⁸³.

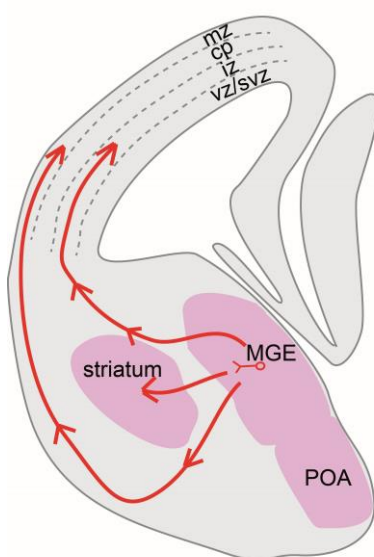


Figure 9 Flux de migration tangentielle des neuroblastes GABAergiques issus de la MGE chez la souris. Schéma représentant une coupe coronale de télencéphale à E13-5-E15,5. Les neuroblastes GABAergiques issus de la MGE migrent vers le striatum ou vers le néocortex. Ceux qui migrent vers le néocortex empruntent un flux superficiel, dans la zone marginale néocorticale (**MZ**, pour *marginal zone*), ou un flux profond, dans la zone intermédiaire (**IZ**, pour *intermediate zone*) néocorticale. Abréviations : zone ventriculaire (**VZ**, pour *ventricular zone*), zone sous-ventriculaire (**SVZ**, pour *subventricular zone*).

Au sein du néocortex, les neuroblastes GABAergiques du flux profond migrent essentiellement dans leur plan coronal, latéralement puis médialement (**Figure 2**)^{54,184-187} alors que ceux du flux superficiel migrent dans toutes les directions^{179,181,185,188,189}. Par exemple, sur des coupes coronales à E13,5 et E15,5, les neuroblastes GABAergiques dans le flux profond présentent un processus conducteur tangent à la zone ventriculaire néocorticale, sans **branchement** (processus secondaire avec un lamellipode peu développé). Les neuroblastes GABAergiques du flux superficiel ne présentent pas un processus conducteur tangent à la zone ventriculaire néocorticale, ce qui indique une direction de migration perpendiculaire ou oblique, sauf si la densité cellulaire importante dans cette couche empêche de bien reconnaître les processus conducteurs¹⁸⁵. Ce point a été confirmé par la suite : une étude indique que les neuroblastes GABAergiques du flux superficiel migrent préférentiellement dans un plan antéro-postérieur, mais pas dans un plan médio-latéral¹⁸⁸.

Des vidéos de neuroblastes GABAergiques fluorescents migrant dans des tranches néocorticales ont permis d'évaluer leur motilité. A E13,5, les neuroblastes GABAergiques du flux profond montrent une plus grande motilité (24 $\mu\text{m}/\text{heure}$) que ceux du flux superficiel (19 $\mu\text{m}/\text{heure}$). Ces derniers sont mêmes parfois stationnaires. A E15,5, les résultats sont similaires, à l'exception que certains neuroblastes GABAergiques du flux profond deviennent stationnaires et que d'autres ne sont plus tangents (ils sont dans un plan oblique vers la pie-mère ou dans un sens contraire aux autres neuroblastes GABAergiques, avec une grande variabilité inter-neuroblaste). De plus, à ce stade, des neuroblastes GABAergiques se trouvent dans la zone ventriculaire néocorticale, sans mouvement préférentiel^{185,188}.

La migration dans la zone marginale a été plus particulièrement étudiée, compte tenu du fait qu'elle n'est pas tangentielle et que les neuroblastes GABAergiques y présentent un comportement fortement différent de ceux du flux profond. Des injections *in vivo* de cristaux colorés en rouge lointain (DiD) ont été réalisées à E16 afin de suivre ces neuroblastes. Il apparaît qu'ils peuvent migrer dans toutes les directions, sur de longues distances (jusqu'à 2 mm). Des résultats similaires ont été obtenus après injection à E12 d'un plasmide exprimant

un rapporteur¹⁸⁸. Sur des vidéos, ces neuroblastes présentent à E15,5 des directions aléatoires ou sont stationnaires¹⁹⁰. Ces derniers présentent des **morphologies multipolaires** (c'est-à-dire qu'ils présentent plusieurs processus ou branchements avec un lamellipode), contrairement aux neuroblastes du flux profond qui migrent de manière dirigée et qui sont **unipolaires** (c'est-à-dire avec un seul processus présentant un lamellipode)¹⁸¹.

B. Structures anatomiques rencontrées pendant la migration tangentielle

De manière générale, les neuroblastes migrent sur des neurones, la glie radiaire, des axones ou de la matrice extracellulaire¹⁷¹. Une des premières structures à avoir été considérée comme substrat de migration des neuroblastes GABAergiques ont été **les axones des neurones corticaux à destination sous-corticale** en étudiant le rôle d'une protéine d'adhérence neuronale qu'ils expriment, la **contactine-2 (cntn2 ou TAG1)**. Cntn2 appartient à la superfamille des immunoglobulines. Les axones des neurones corticaux à destination sous-corticale commencent à se développer vers E13,5, restent stationnaires à la frontière entre le pallium et le subpallium entre E13,5 et E14,5, puis entrent dans le subpallium jusqu'à E17,5 où ils sont observés dans la **capsule interne** (La capsule interne regroupe les fibres qui se projettent sur ou qui proviennent du cortex et qui sont dirigées ou proviennent du thalamus et du tronc cérébral)¹⁹¹. L'expression de cntn2 commence dans le pré-plateau à E12,5, puis devient intense vers E14,5 dans les régions néocorticales basolatérales (dans leur zone marginale, plaque corticale et zone intermédiaire) ainsi que dans la capsule interne. A E17,5, ce sont les régions néocorticales dorsomédiales qui présentent ce profil expression. Cntn2 n'est plus exprimée à la naissance. Des cristaux de Dil ont été placés dans le néocortex afin de marquer les axones des neurones corticaux à destination sous-corticale. Cntn2 colocalise avec le Dil, confirmant que les axones corticaux à destination sous-corticale synthétisent cntn2. De plus, des neuroblastes GABAergiques colocalisent avec cntn2¹⁹², suggérant une interaction entre ces neuroblastes et les axones

des neurones corticaux à destination sous-corticale. Des tranches néocorticales ont été incubées avec des anticorps dirigés contre *cntn2* pour empêcher toute interaction avec cette protéine. La conséquence était une diminution du nombre de neuroblastes GABAergiques en migration. Ce résultat n'a pas été obtenu en faisant de même contre la molécule d'adhérence *I1cam*, appartenant elle aussi à la superfamille des immunoglobulines, et exprimée dans les axones des neurones thalamo-corticaux et de certains neurones corticaux à destination sous-corticale¹⁹³⁻¹⁹⁶. Quelques années plus tard, le même groupe a étudié les embryons mutants homozygotes pour *Cntn2*. Chez ces embryons, les axones des neurones corticaux à destination sous-corticale sont en place, et l'immuno-marquage pour *I1cam* est semblable à celui des embryons sauvages. Contrairement aux résultats du travail décrit ci-dessus, les neuroblastes GABAergiques ne présentent pas de défaut de migration tangentielle¹⁹⁷. Des cultures *in vitro* de cellules issues de la MGE d'embryons sauvages sur des axones néocorticaux (obtenus après dissociation de tranches néocorticales) révèlent cependant que les neuroblastes GABAergiques contactent les axones néocorticaux, à des fréquences faibles¹⁹². De plus, si ces cellules proviennent de la MGE d'embryons sauvages à E12,5, elles migrent préférentiellement sur des axones exprimant *cntn2* que sur des axones exprimant le neurofilament de type P, également présent dans les axones. Les cellules provenant de la MGE à E15,5 présentent des résultats inverses¹⁹². **Ainsi, si rien ne permet de conclure quant au rôle des axones des neurones corticaux à destination sous-corticale dans la migration tangentielle des neuroblastes GABAergiques, il semblerait que *cntn2* participe à la migration de ceux nés précocément dans la MGE (donc sans doute de futurs interneurons à somatostatine).**

Récemment, le rôle des **axones thalamo-corticaux** a été étudié. Ces axones connectent de manière ipsilatérale les différents noyaux thalamiques à leurs régions néocorticales correspondantes. Par exemple, le corps (ou noyau) genouillé (ou géniculé) médial du thalamus (MGB ou MGN), le noyau thalamique auditif, projette ses axones dans le cortex auditif. Le développement des axones thalamo-corticaux est synchronisé à celui des

neuroblastes GABAergiques : les axones thalamo-corticaux traversent la capsule interne à environ E13, franchissent le subpallium puis voyagent le long des voies de migration des neuroblastes GABAergiques dans le néocortex. Ils arrivent dans leur région néocorticale finale aux alentours d'E16. Ils y restent, dans le sous-plateau/la zone intermédiaire, pendant un ou deux jours puis envahissent la plaque corticale aux alentours de E18^{198,199}. La migration tangentielle des neuroblastes GABAergiques a été étudiée chez des embryons mutants dépourvus d'axones thalamo-corticaux (mutants homozygotes pour *Gbx2*). Le nombre global d'**interneurones immatures** (je parlerai d'interneurone immature lorsque le neuroblaste est arrivé dans le cortex et perd son phénotype migratoire) à la naissance était comparable chez ces mutants et les sauvages, ce qui indiquerait une absence de défaut de migration tangentielle et/ou de prolifération dans le subpallium. Et en effet aucun défaut de prolifération ou de proportion de neuroblastes GABAergiques dans les flux superficiel et profond n'ont été observés²⁰⁰. **Ainsi, rien n'indique un rôle des axones thalamo-corticaux dans la migration tangentielle des neuroblastes GABAergiques.** Une étude récente montre l'expression de la **cadherine-13 (cdh13)** dans les axones thalamo-corticaux et une colocalisation avec la calbindine-1 (synthétisée par certains neuroblastes GABAergiques), suggérant une interaction entre ces deux populations, sans preuve expérimentale²⁰¹.

Une autre structure qui a été considérée est la **glie radiaire**, qui correspond aux processus basaux des progéniteurs apicaux. Les neuroblastes glutamatergiques migrent notamment radialement le long de la glie radiaire. Nous verrons plus tard ce qu'il en est pour la migration radiaire des neuroblastes GABAergiques. Concernant leur migration tangentielle, la glie radiaire a été détruite chez des embryons de furets par une injection de méthylazoxyméthanol acetate (MAM), ce qui a conduit à une migration radiaire anormale des neuroblastes glutamatergiques. Dans ce cas, le flux profond de migration tangentielle des neuroblastes GABAergiques est conservé (neuroblastes marqués par du Dil), même si leur nombre n'a pas été quantifié²⁰².

Une autre équipe a étudié les interactions entre les neuroblastes GABAergiques et la glie radiaire grâce à des embryons rapporteurs, qui ont permis aux auteurs de filmer les neuroblastes GABAergiques. Dans cette expérience, les neuroblastes GABAergiques expriment une protéine fluorescente verte et la glie radiaire une protéine fluorescente rouge. En ce qui concerne les neuroblastes GABAergiques du flux superficiel, ils contactent les extrémités de la glie radiaire, qui forment une sorte de tamis, lors de leur migration aléatoire. Suite à ces contacts, 73% d'entre eux continuent leur migration dans leur sens initial, 11% vont dans le sens opposé, 8% s'arrêtent et 8% entrent dans la plaque corticale. Ainsi, si la grande majorité des neuroblastes à un temps et un lieu donnés migrent indépendamment de la glie radiaire, 27% d'entre eux changent leur comportement migratoire suite à ce contact. En ce qui concerne les neuroblastes GABAergiques du flux profond, leur migration perpendiculaire au sens de la glie radiaire laisserait penser qu'ils migrent de manière indépendante de la glie radiaire. Cependant, là encore, des contacts ont lieu entre ces deux populations. Suite à ces contacts, 54% des neuroblastes GABAergiques continuent leur migration dans leur sens initial, 15% vont dans le sens opposé, 16% s'arrêtent et 14% entrent dans la plaque corticale. Ainsi, près de la moitié d'entre eux change son comportement migratoire suite à ces contacts¹⁸⁹.

Ces résultats suggèrent un rôle de la glie radiaire dans la terminaison de la migration tangentielle, et donc dans la détermination de la localisation finale des neuroblastes GABAergiques. **Aucun indice n'indique cependant un rôle direct de la glie radiaire dans la migration tangentielle elle-même.** La précision de la nature de ces contacts et la mise en évidence des molécules impliquées (la glie radiaire exprime par exemple des molécules d'adhérence comme les glycoprotéines astrotactines (astn), des neurégulines ou des intégrines²⁰³) permettront de confirmer ou non cette hypothèse. Il serait intéressant d'étudier la localisation subcellulaire de ces molécules, peut-être différentielle entre l'extrémité de la glie radiaire dans la zone marginale et ses prolongements dans la zone intermédiaire.

En conclusion, à ce jour, aucune expérience n'a pu montrer un rôle majeur des axones des neurones corticaux à destination sous-corticale, des axones thalamo-corticaux ou de la glie radiaire dans la migration tangentielle. Cependant, il existe des contacts transitoires entre les neuroblastes GABAergiques et ces structures. Si ces études n'ont pas observé de défaut majeur de migration des neuroblastes GABAergiques en leur absence, rien n'empêche des rôles plus fins ou affectant des sous-populations de neuroblastes GABAergiques (d'âges différents ou présentant des molécules d'adhérence différentes). Ce dernier cas devra être pris en considération, lorsque des molécules spécifiques de ces différentes structures auront été identifiées et invalidées, comme cela a été tenté pour *cntn2*.

C. Molécules diffusibles impliquées dans la migration tangentielle

Les neuroblastes GABAergiques ont intrinsèquement la capacité de migrer ce qui est illustré par leur motilité *in vitro*. Cependant, leur migration est guidée par des molécules diffusibles dans l'environnement, qui leur permettent d'éviter certaines structures et de migrer vers le néocortex.

Les neuroblastes GABAergiques quittent la MGE en réponse à des molécules répulsives comme *slit1*, nétrine-1 (*ntn1*, détectée par les neuroblastes GABAergiques par *unc5b*) et l'éphrine de type A ***efna5***, exprimées dans la zone ventriculaire de la MGE^{49,177,204-206}. Ils répondent à ce dernier signal en portant le récepteur ***epha4***. En l'absence d'expression d'*efna5* dans les zones prolifératives de la MGE, une invasion ectopique des neuroblastes GABAergiques dans la MGE est observée^{55,205}. Les mammifères possèdent neuf **récepteurs aux éphrines de type A** (*epha1* à *epha9*) et cinq **récepteurs aux éphrines de type B** (*ephb1* à *ephb5*). Les récepteurs aux **éphrines de type A** lient toutes

les cinq éphrines de type A (efna1 à efna5), ceux de type B toutes les trois **éphrines de type B** (efna1 à efna3), à l'exception de epha4 qui interagit avec toutes les éphrines et ephb2 qui interagit avec efna5^{207,208} (**Figure 10**).

Les neuroblastes GABAergiques répondent ensuite à plusieurs molécules qui promeuvent leur migration tangentielle, *in vivo* et/ou *in vitro*, comme le **brain-derived neurotrophic factor (BDNF)**, le **glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF)**, la **neurotrophine-4 (ntf4** ou ntf5), le **facteur de croissance hépatocytaire (HGF)** et **efna2**. En l'absence de ces molécules, les neuroblastes GABAergiques présentent une plus faible motilité et peu d'entre eux entrent dans le néocortex^{176,209-213}. Le rôle de ces différentes molécules diffusibles dans le développement des neuroblastes GABAergiques a été confirmé par les défauts de migration tangentielle observés chez les embryons pour les différents récepteurs synthétisés par les neuroblastes GABAergiques : le **récepteur tyrosine kinase (trkB)** qui détecte le BDNF et ntf4, le récepteur **GFR α 1** et la **protéine transmembranaire syndecan-3 (sdc3)** qui détectent le GDNF, **epha4** qui détecte efna2²¹²⁻²¹⁷ (**Figure 10**).

Les neuroblastes GABAergiques issus de la MGE évitent l'aire préoptique et le striatum. Ils évitent l'aire préoptique qui exprime **efnb3**, qu'ils détectent via epha4²¹⁸ (**Figure 10**). Dans un premier temps, une action de action de slit avait été proposée, mais cette hypothèse n'a pas été validée expérimentalement^{49,177}.

En ce qui concerne l'évitement du striatum, il semblerait que sema3a et sema3f, qui y sont exprimées, jouent ce rôle répulsif. En effet, les neuroblastes GABAergiques qui formeront les futurs interneurons néocorticaux portent nrp1, un récepteur aux sémaphorines, mais pas les neuroblastes GABAergiques qui vont dans le striatum²¹⁹⁻²²¹. Des éléments contradictoires concernent nrp2. Son expression est inhibée par *Dlx1* et *Dlx2*, ce qui suggère une absence d'implication de nrp2, mais les souris *Nrp2*^{-/-} présentent une diminution du nombre d'interneurones néocorticaux et une augmentation du nombre

d'interneurones striataux. Il est donc probable que *nrp2* joue un rôle précoce au moment de l'évitement du striatum puis que son expression s'éteint dans les neuroblastes^{154,222}. Il a été montré que le récepteur *robo1* mais pas *robo2* (bien que les neuroblastes GABAergiques l'expriment aussi) interagit avec *nrp1*, modulant la réponse aux sémaphorines (indépendamment de *slit*¹⁸⁴). Chez les embryons mutants homozygotes pour *Robo1*, des neuroblastes GABAergiques néocorticaux sont ainsi retrouvés dans le striatum^{131,223}. Certaines études ont pointé le fait que les sémaphorines ne diffusent pas en dehors du striatum, à cause de l'expression en son sein de chondroïtine sulfate^{219,220,224} (**Figure 10**).

En plus des sémaphorines, l'expression d'**efna3** dans le striatum et de ses récepteurs dans les futurs interneurones néocorticaux (notamment *epha4*) pourrait les empêcher d'entrer dans le striatum²¹¹, mais cela n'a pas encore été validé expérimentalement⁵⁸. La voie de migration des futurs interneurones néocorticaux est donc bornée par deux éphrines de type A (*efna5* dans les zones prolifératives et *efna3* dans le striatum) et marquée par une autre éphrine de type A (*efna2*), leur permettant de suivre leur voie entre autres grâce au récepteur *epha4*^{211,218} (**Figure 10**).

Comment expliquer l'existence de deux populations de neuroblastes GABAergiques issus de la MGE, l'une allant dans le striatum et l'autre dans le néocortex, alors que toutes les deux expriment initialement *Nkx2.1*, et que certains interneurones des deux structures ont la même origine clonale^{158,160,162} ? Lors de leur entrée dans le néocortex, les futurs interneurones néocorticaux cessent d'exprimer *Nkx2.1* ainsi que le gène codant pour le récepteur à *ntn1* qui sous-tend la répulsion axonale, **unc5b**. Ces inhibitions transcriptionnelles sont dépendantes du facteur de transcription en doigt de zinc **zeb2** (*sip1*). En l'absence de **zeb2**, les neuroblastes GABAergiques ne perdent pas leur motilité mais leur aptitude à capter les signaux de l'environnement local. Grâce à ces modifications d'expression génique, les deux populations de neuroblastes GABAergiques néocorticaux et striataux ségrégent^{55,220,225,226} (**Figure 10**).

Au sein du néocortex, la **neuréguline-1** (*nrg1*), qui appartient à la famille des facteurs de croissance, agit comme molécule attractive des neuroblastes GABAergiques. Ces derniers expriment son récepteur à fonction tyrosine kinase, **erbb4** (sa phosphorylation par la kinase dépendante des cyclines *cdk5* est nécessaire à la migration tangentielle), récepteur qui contient **un domaine PDZ**^{177,227,228}. *Nrg1* se présente sous deux isoformes : une isoforme associée à la membrane, **CRD-nrg1** et une isoforme diffusible **IG-nrg1**. La première est exprimée le long des voies de migration tangentielle et la seconde est diffuse dans le néocortex²²⁹. La première agit comme un attractant à courte distance et la seconde à longue distance²²⁹⁻²³¹ (**Figure 10**).

En plus de *nrg1*, la molécule attractante **cxcl12** (**sdf1**), détectée par les neuroblastes GABAergiques via leurs récepteurs couplés aux protéines G **cxcr4** (**sdf1r**) et **ackr3** (**cxcr7**), est exprimée le long des voies de migration tangentielle²³² (**Figure 10**). A E13,5, *cxcl12* est exprimée seulement dans la zone marginale, puis dans les flux profond et superficiel²³³, ce qui pourrait expliquer pourquoi les neuroblastes peuvent passer du flux profond au flux superficiel à des stades précoces (ils ne sont pas retenus dans le flux profond). Cette expression semble expliquer pourquoi les neuroblastes GABAergiques évitent la plaque corticale, qui semble cependant permissive à ces neuroblastes GABAergiques et où l'action d'aucune molécule répulsive n'a été formellement identifiée (les sémaphorines ont été proposées, mais sans validation expérimentale²³⁴)²³⁵. Chez les mutants pour les gènes *Cxcl12*, *Cxcr4* ou *Ackr3*, les neuroblastes GABAergiques présentent de multiples branchements et les flux de migration ne sont plus marqués (les neuroblastes GABAergiques envahissent plus tôt la plaque corticale), conduisant à une mauvaise distribution des interneurons dans les couches néocorticales et à une diminution de leur nombre après la naissance, notamment dans les régions dorsales du néocortex^{55,58,181,185,233,235-249}.

La voie slit (*slit1* et *slit2*)/robo (*robo1*, peut-être *robo3*) semble impliquée dans la migration tangentielle, au moins pour le flux profond. Des anomalies morphologiques (longueur du processus conducteur et nombre de branchements) sont observées chez les

mutants homozygotes pour *Slit1*, *Slit2*, *Robo1* et *Robo3*, conduisant à une diminution du nombre d'interneurones au moins dans la partie ventrale du néocortex^{131,250-252}. Cependant, ces résultats sont à prendre avec mesure, car des défauts de développement des axones cortico-thalamiques et thalamo-corticaux sont observés chez ces mutants²⁵¹. Néanmoins, l'étude de ces modèles pourrait permettre d'étudier le rôle de ces axones dans la migration des neuroblastes GABAergiques, d'une part, et de *slit1* et *slit2* comme molécules de guidage de ces neuroblastes, d'autre part.

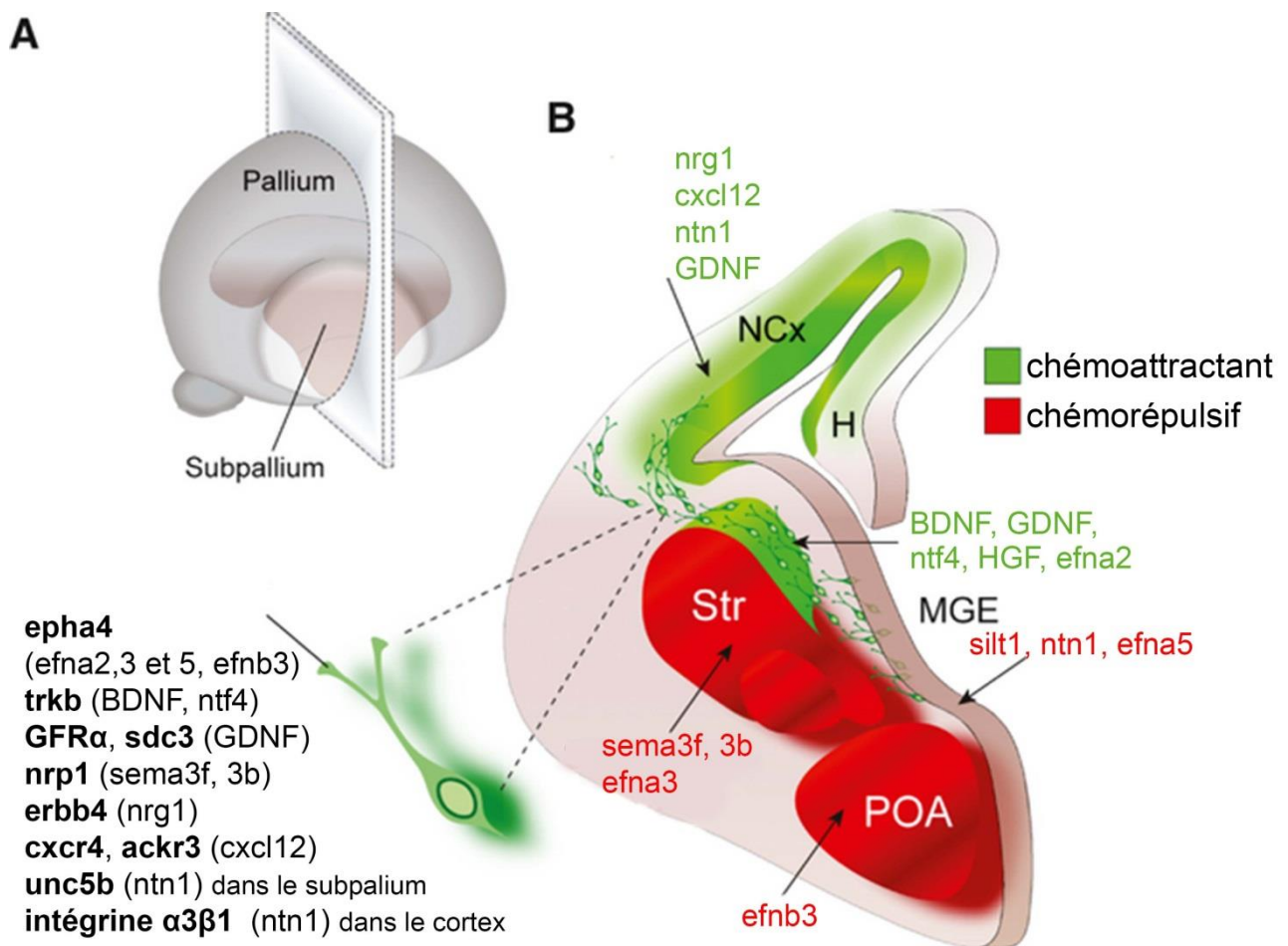


Figure 10 Molécules diffusibles impliquées dans la migration tangentielle des neuroblastes GABAergiques à destination néocorticale. **A**, Représentation du cerveau embryonnaire à E13,5 ainsi qu'un plan de section coronal. **B**, Schéma représentant une coupe coronale de télencéphale à E13,5. En rouge sont indiquées les molécules chémorépressives, en vert les chémoattractantes, ainsi que leur territoires d'expression. A gauche, un neuroblaste GABAergique à destination néocorticale avec la liste en gras des récepteurs qu'il exprime (entre parenthèses les molécules détectées par ces récepteurs). Abréviations : néocortex (NCx), striatum (Str), hippocampe (HP). Adapté de Marin, 2013⁵⁸.

Il a été montré *in vitro* que les neurotransmetteurs que sont le GABA, la glycine, le glutamate et la dopamine, favorisent le début de la migration des neuroblastes GABAergiques dans le subpallium, leur entrée dans le néocortex et leur migration au sein du néocortex, via, respectivement, les récepteurs ionotropiques **GABA_A** et **GABA_B** (*a priori* GABA_A dans le flux profond et GABA_B dans le flux superficiel²⁵³), **glra** (glyr), **GRIN** (NMDA) et **GRIA1** (AMPA), **drd1** et **drd2** (le rapport entre les quantités de ces deux récepteurs favorise ou inhibe la migration des neuroblastes GABAergiques)^{198,235,254-263}. Il semblerait que ces neurotransmetteurs agissent en dépolarisant la membrane des neuroblastes GABAergiques en migration. Le GABA et la glycine sont dépolarisants à ce stade développemental car les neuroblastes GABAergiques expriment les cotransporteurs actifs des ions sodium, potassium et chlorure **slc12a2** (**nkcc1**) et **slc12a1** (**nkcc2**) faisant entrer les ions chlorures dans les cellules, ce qui entraîne un effet dépolarisant du GABA^{55,58,261}. Dans tous les cas, lorsque l'action de ces neurotransmetteurs est inhibée, notamment celle du GABA, les neuroblastes GABAergiques présentent des anomalies morphologiques (processus conducteur plus court par exemple, suggérant un rôle de promoteur de la croissance des neurites)²⁶⁴. Une question se pose toutefois, quant aux cellules qui expriment ces neurotransmetteurs et la façon dont leur sécrétion est régulée.

Certains indices suggèrent que les flux superficiel et profond font appel à des molécules différentes pour guider les neuroblastes GABAergiques, et probablement dans des temporalités différentes (puisque le flux superficiel est plus important que le flux profond aux stades précoces)²⁶⁵. Par exemple, **ntn1** est synthétisée dans la zone marginale (mais pas dans le flux profond), en plus d'être synthétisée dans les zones prolifératives de la MGE. Son absence d'expression ou celle de son récepteur, **intégrine α3β1**, par les neuroblastes GABAergiques (voire de leur double absence d'expression) entraînent une diminution du nombre de neuroblastes GABAergiques migrants dans le flux superficiel, avec une augmentation de ce nombre dans le flux profond²⁶⁶. Des expériences de co-immunoprécipitation montrent que **ntn1** et l'intégrine **α3β1** interagissent directement. Le fait que **ntn1**

ait un rôle répulsif dans la MGE et un rôle attractif dans le néocortex est probablement dû à l'expression de deux récepteurs différents : *unc5b* dans le subpallium (perdu par les neuroblastes GABAergiques lors de leur entrée dans le néocortex) et l'intégrine $\alpha3\beta1$ dans la zone marginale du néocortex (**Figure 10**). A la naissance, chez les mutants doubles homozygotes, le nombre total d'interneurones immatures est deux fois plus faible et le nombre de cellules en apoptose est plus important par rapport à des animaux sauvages. Ce résultat est étonnant, compte tenu du fait que le flux profond concentre plus de neuroblastes GABAergiques, comme s'il y avait une compensation. Il est donc possible qu'en l'absence de flux superficiel, certains neuroblastes GABAergiques (peut-être ceux qui auraient dû emprunter ce flux) n'arrivent pas à s'intégrer dans le néocortex, suggérant des défauts d'entrée en migration radiaire ou de synaptogenèse.

On a rapporté entre les deux flux des différences d'expression pour des gènes codants pour des récepteurs ou des protéines d'adhérence cellulaire, comme des protéines appartenant à la famille des immunoglobulines (*alcam*, *islr2*), des cadhérines de type II (***cdh8***, ***cdh10***), *cdh13*, des protocadhérines (***pcdh11x*** ou ***pcdh11***), des protéines apparentées aux cadhérines (***cdhr10*** ou ***fat3***), des récepteurs (*nsmf* ou *nelf*), des protéines transmembranaires riches en domaines leucine et fibronectine (*flrt2*), des protéines à domaine sushi (*csmd3*), ou autres protéines d'adhérence (*mdga2*, la neuritine-1 ou *nrn1*, la plexine-C1 ou *plxnc1*, *ptpro*, *ptprz1*)^{55,267}.

En plus des molécules impliquées dans la ségrégation des flux superficiel et profond, il a récemment été proposé que les récepteurs ***ephb1*** et ***ephb2***, exprimés par les neuroblastes GABAergiques, sont impliqués dans la séparation de deux flux profonds : celui dans la zone ventriculaire/sous-ventriculaire et celui dans la zone intermédiaire. L'expression de ces récepteurs est sous le contrôle d'*Ascl1* et *Dlx2*¹⁰⁹.

D. Aspects subcellulaires de la migration tangentielle

Chaque neuroblaste GABAergique dispose de plusieurs processus dynamiques, dont le processus conducteur dans le sens de sa migration. Chaque processus se termine par un lamellipode, particulièrement élaboré à l'extrémité du processus conducteur. D'une certaine manière, le processus conducteur se comporte comme un axone en croissance. En effet, les processus conducteurs présentent un comportement exploratoire. Les lamellipodes détectent les molécules de l'environnement local et conduisent à l'élongation ou à la rétraction de leur processus. Seul le processus conducteur, répondant aux molécules attractives, s'allonge avec un lamellipode bien développé. Les autres branchements se rétractent et ont un lamellipode peu développé ou qui se rétracte lui aussi (en anglais, *collapse*). Pour changer de direction, les neuroblastes GABAergiques peuvent inverser leur polarité (migration en sens inverse). Plus généralement, si le neuroblaste change de direction, un nouveau processus (branchement) s'allonge et devient processus conducteur au détriment de l'ancien processus conducteur qui se rétracte. L'existence de ces branchements est une des particularités des neuroblastes GABAergiques (qu'ils partagent avec les neurones du pont, dans le myélocéphale, et ceux de la voie rostrale de migration). Ces branchements permettent aux neuroblastes GABAergiques de détecter les signaux de l'environnement provenant de plusieurs directions et d'y répondre rapidement en changeant de direction de migration (un seul processus, sans branchements, ne permet de détecter ces signaux que dans un seul axe)^{171,174,176,178,180,268} (**Figure 11**).

Après s'être allongé, le processus conducteur se stabilise. A ce moment-là, les organelles que sont le **cil primaire**, le **centrosome**, l'**appareil de Golgi** et les **mitochondries**, situées initialement autour du noyau, se déplacent de 15-30 μm à l'avant du noyau, dans le processus conducteur lui-même pour former **une zone de gonflement** (en anglais, *swelling*). Une dizaine de minutes après la formation de cette zone de gonflement, le noyau se déplace à son tour pour rejoindre les organelles. Ce mouvement du noyau est

suivi d'une rétraction du processus arrière. Le noyau et les organelles effectuent ainsi un **mouvement** (en anglais, *nucleokinesis*) dit saltatoire²⁶⁹ (**Figure 11**).

En plus du lamellipode, le cil primaire (une organelle composée de microtubules issus du centriole maternel chez les neuroblastes GABAergiques²⁷⁰) détecte lui aussi les signaux de l'environnement. Chez les neuroblastes GABAergiques, le cil primaire est riche en récepteurs *trkB*, *GFR α 1*, *cxcr4* et *ackr3*, *erbb4*, *robo1* et *robo2*. Le cil primaire des neuroblastes GABAergiques est plus motile (il s'allonge, se raccourcit voire entre en rotation) au cours des phases stationnaires et de migration. L'absence de l'arf GTPase **arl13b**, localisée dans le cil primaire, entraîne une disparition de cette organelle et l'incapacité des cellules à transduire les signaux de l'environnement, comme celui de *ssh*²⁷¹. En l'absence d'*arl13b* dans les neuroblastes GABAergiques, et donc de leur cil primaire, le nombre de neuroblastes GABAergiques qui entrent dans le néocortex est réduit de 50%. Les neuroblastes GABAergiques s'accumulent dans ce cas à la frontière entre le pallium et le subpallium et présentent une augmentation du nombre de processus. En l'absence d'*arl13b* mais sans disparition du cil primaire, les marquages ciliaires pour les récepteurs qui y sont situés sont diminués en intensité, suggérant une diminution de la réponse des neuroblastes aux signaux de l'environnement²⁷².

L'élongation du processus conducteur, l'effondrement du lamellipode, le mouvement saltatoire du noyau et des organelles font appel aux cytosquelettes de tubuline et d'actine²⁷³. Les microtubules forment une cage autour du noyau (cage périnucléaire), impliquée dans l'avancée des organelles, et exercent une force de poussée au sein du processus conducteur. Le cytosquelette de tubuline est sensible aux signaux de l'environnement, comme celui des sémaphorines. Ces dernières activent dans ce processus l'enzyme kinase sérine/thréonine *GSK3 β* , ce qui déstabilise les microtubules. A l'inverse, les molécules attractives favorisent l'élongation des processus le long de leurs gradients et entraînent une stabilisation du cytosquelette de ces processus^{55,274,275}.

Le cytosquelette d'actine est particulièrement impliqué dans la force de traction au sein du lamellipode et l'avancée du noyau. L'avancée de ce dernier se fait de manière indépendante de l'élongation du processus conducteur et de l'avancée des organelles. La **myosine non musculaire 10 (myh10 ou myhn2)** est localisée à l'arrière du noyau (**Figure 11**). Elle est impliquée dans la contraction de l'actine à l'arrière du noyau. C'est la contraction de l'actine à l'arrière du noyau qui le fait avancer dans la zone de gonflement. La formine **diaph1 (mdia)** qui est un nucléateur d'actine et un des effecteurs des rho GTPases, est impliquée dans la migration tangentielle, notamment en contrôlant la contraction du cytosquelette d'actine à l'arrière du noyau. En l'absence de diaph1, le noyau avance avec un retard. En ce qui concerne le lamellipode, la dynamique du cytosquelette d'actine est dépendante des signaux de l'environnement, comme celui des sémaphorines. Ces dernières entraînent l'activation de rho GTPases (par exemple rac1 et rhoA) conduisant à une diminution du renouvellement de l'actine ou une augmentation de la contraction des filaments d'actine, ayant pour conséquence un effondrement du lamellipode. La protéine **disc1** (pour *disrupted in schizophrenia-1*) est exprimée à l'arrière du noyau et au niveau du lamellipode. Elle co-localise avec l'actine et des éléments suggèrent une interaction avec le cytosquelette d'actine^{22,25,55,178,182,268,276-286}.

Peu d'éléments sont connus quant à la transduction des signaux de l'environnement sur la régulation du cytosquelette. Certains membres de ces voies ont été identifiés, mais ils ne constituent probablement que la partie émergée d'un iceberg moléculaire. Deux de ces protéines sont la **doublecortine (dcx)** et l'enzyme **pafah1b1** (lissencéphalie-1 ou **lis1**). Elles stabilisent les microtubules et participent à l'avancée du centrosome. L'inactivation de *Dcx* et *Pafah1b1* conduit à des défauts de polarité cellulaire. L'interaction de pafah1b1 avec le cytosquelette de tubuline est conservée chez beaucoup d'espèces, comme les champignons (*Aspergillus nidulans*), la drosophile (*Drosophila melanogaster*) ou les levures (*Saccharomyces cerevisiae*). Dans ces espèces, les orthologues de *Pafah1b1* codent pour des protéines qui interagissent avec la tubuline- α et les dynéines. Elles participent à la dynamique et la polarité du cytosquelette de tubuline ainsi qu'à l'avancée du noyau. Chez les

embryons murins mutants homozygotes pour *Dcx*, les neuroblastes présentent un lamellipode anormalement large, parfois divisé en plusieurs cônes, et un nombre important de branchements, ce qui entraîne un défaut de mouvement du noyau et de polarité du centrosome. Ces anomalies ont pour conséquence des défauts de direction de migration^{171,273,288,289}. *Dcx* peut interagir avec *pafah1b1* et participe de son côté à l'assemblage des microtubules, mais participe aussi à la régulation du cytosquelette d'actine. En l'absence de l'un d'entre eux dans les neuroblastes en migration, le centrosome et le noyau sont moins couplés, le processus conducteur s'allonge moins, et des défauts de branchements sont observés²⁹⁰. Les autres molécules indentifiées comme participant à la transduction des signaux de l'environnement sont des dynéines, des kinases associées aux protéines apparentées à *dcx* (*dclk*) et leurs régulateurs en amont comme *cdk5* qui phosphoryle *pak1* et *cdkn1b* (*p27kip1*), et les kinases *mapk* (*jnk*)^{273,275,288,289,291-302}.

Les facteurs de transcription exprimés dans les éminences ganglionnaires (*dlx1*, *dlx2*, *dlx5*, *dlx6*, *lhx6* et *arx*) sont également impliqués dans la migration des neuroblastes GABAergiques, permettant entre autres l'expression des récepteurs aux molécules diffusibles. En l'absence de ces facteurs de transcription, les neuroblastes GABAergiques présentent *in vivo* un délai d'entrée dans le néocortex et des anomalies de distribution en son sein ainsi que des défauts intrinsèques de migration *in vitro*^{22,55,116,117,226,292,296,303-307}. Chez les embryons doubles homozygotes pour *Dlx1* et *Dlx2*, les neuroblastes ont des processus plus longs et ont des défauts de migration tangentielle et radiaire. Ces défauts sont corrélés à une expression plus abondante de protéines régulatrices du cytosquelette dont la sérine/thréonine kinase *pak3*, en aval de *cdc42* et *rac1*, et *map2*^{121,296}. De manière énigmatique, *dlx5* est exprimé dans le cytoplasme des neuroblastes GABAergiques en migration, sans qu'une fonction à cette expression ait été encore trouvée¹¹¹. Comme je l'ai déjà évoqué, *Nkx2.1* cesse d'être exprimé lors de l'entrée des neuroblastes GABAergiques dans le néocortex, ce qui est probablement à l'origine de modifications transcriptionnelles de

gènes impliqués dans la migration tangentielle et dans la détection de signaux de l'environnement (par exemple *Nkx2.1* inhibe l'expression de *Nrp2*)^{220,308}.

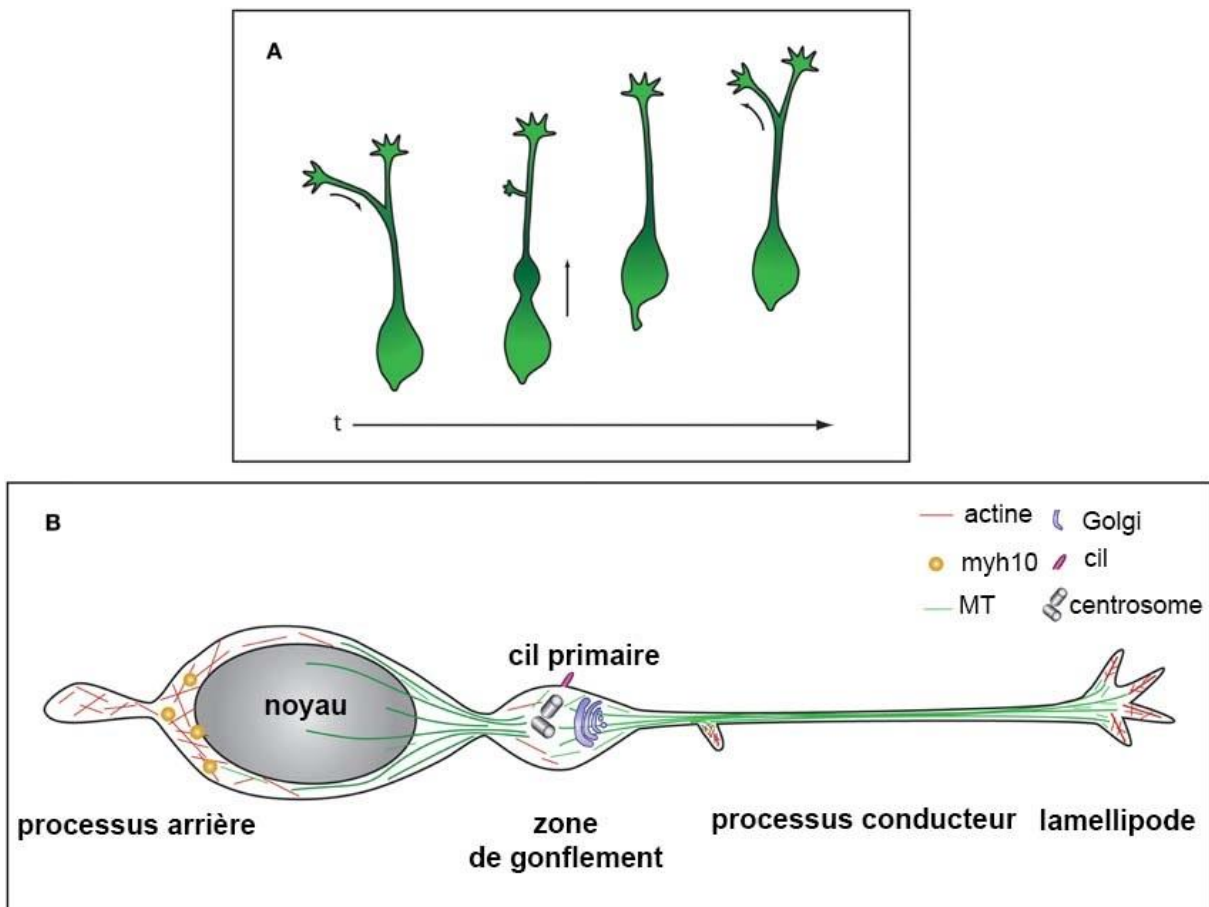


Figure 11 Aspects subcellulaires de la migration tangentielle des neuroblastes GABAergiques. **A**, Les différentes étapes de la migration : le neuroblaste rétracte le branchement au profit du processus conducteur, puis élabore une zone de gonflement où avancent les organelles ; le noyau avance ensuite dans la zone de gonflement, laissant un processus arrière, qui se rétracte ensuite. **B**, Représentation des organelles (cil primaire, appareil de Golgi, centrosome), des cytosquelettes d'actine et de tubuline (MT) ainsi que de la localisation de myh10. Adapté de Peyre *et al.*, 2015²⁸⁷.

Bien que peu décrit chez les neuroblastes GABAergiques, voire chez les neuroblastes en général, les cellules en migration adhèrent à leur substrat de migration par des sites d'attachement ou d'adhérence, comme chez les fibroblastes¹⁷¹. En plus des molécules diffusibles bien décrites, un champ reste probablement à être exploré : celui des forces mécaniques impliquées dans la migration des neuroblastes et le bourgeonnement des axones. Les protéines d'adhérence cellulaire, en plus de ce rôle d'adhérence, peuvent participer à la transduction à l'intérieur de la cellule des forces mécaniques qu'elles

défectent, par transduction mécano-électrique (impliquée dans le bourgeonnement des axones, via *piezo1* par exemple³⁰⁹) ou en étant associées au cytosquelette d'actine^{310,311}. Quelques protéines d'adhérence ont toutefois été décrites dans les neuroblastes GABAergiques. Outre les protéines exprimées de manière différentielle dans les différents flux de migration déjà citées, la **cadhérine-2** (*cdh2* ou *ncad*), cadhérine de type I, ainsi que la cadhérine de type flamingo **CELSR3** (*fmi1* ou *adgrc3*), appartenant aussi à la famille des **récepteurs d'adhérence couplés aux protéines G** (**aGPCRs**), ont été décrites comme jouant un rôle crucial dans la migration des neuroblastes GABAergiques (**Partie V**). La **molécule d'adhérence cellulaire neuronale** (**NCAM1**) a récemment été décrite dans les neuroblastes GABAergiques et permettrait le regroupement (en anglais, *clustering*) *in vitro* des récepteurs **epha3** (récepteur de *efna5*) en interagissant avec eux. L'absence d'interaction entre NCAM1 et *epha3* empêche le regroupement de ces récepteurs et conduit à l'effondrement des lamellipodes³¹². Ce dernier élément devra être étudié *in vivo*. Il serait intéressant de voir si *epha4* interagit lui aussi avec des protéines d'adhérence pour former des regroupements, car c'est surtout *epha4* qui intervient dans la migration des neuroblastes GABAergiques.

La régulation du trafic membranaire des protéines d'adhérence, en particulier des récepteurs d'adhérence, est au cœur de la motilité cellulaire. Elle permet le détachement de la cellule à l'arrière, et son adhérence à l'avant. Ce trafic implique un contrôle des rapports entre exocytose et endocytose à l'arrière et à l'avant de la cellule. Plusieurs protéines d'adhérence ont été retrouvées dans les compartiments endocytaires, à proximité des sites de contact dans des neuroblastes, comme *astn1*, *cdh2* ou des intégrines. En plus d'un contrôle de l'exocytose et de l'endocytose, la polarité cellulaire intervient aussi de manière générale dans l'adhérence des cellules à leur substrat, notamment en faisant intervenir la GTPase *rap1*, *cdh2*, ou encore le complexe comprenant les régulateurs de polarité cellulaire *pard3*, *pard6* (*par6*), la protéine kinase PKC ζ et *cdc42*. De manière générale, les rho GTPases comme *rac1* et *cdc42*, ainsi que les ras GTPases comme RAPGEF2 se situent aux sites d'adhérence cellulaire et opèrent l'adhérence intercellulaire des cadhérines. Elles

interagissent de manière directe ou indirecte avec les caténines *ctnnb* ; par exemple, de manière indirecte en faisant intervenir un domaine PDZ (la kinase *magi2* est l'un des intermédiaires à domaines PDZ). Le rôle de certaines protéines d'adhérence ayant été suggéré dans le développement des neuroblastes GABAergiques, il est probable qu'elles soient liées à ces aspects d'adhérence cellulaire^{171,313,314}.

En conclusion, les neuroblastes GABAergiques à destination néocorticale quittent la MGE et évitent l'aire préoptique ainsi que le striatum en évitant des molécules répulsives (notamment des éphrines et sémaphorines), et suivent des signaux attractants (notamment BDNF, GDNF, *ntf4*, HGF, *efna2*). Leur entrée dans le néocortex, en franchissant la frontière entre le pallium et le subpallium, s'accompagne de modifications transcriptionnelles (par exemple l'inhibition de l'expression de *Nkx2.1*) leurs permettant de répondre à de nouveaux signaux marquant les deux principaux flux de migration tangentielle superficiel et profond (*nrg1*, *cxcl12* et *ntn1*). Les neuroblastes GABAergiques détectent ces molécules par différents récepteurs qu'ils synthétisent (notamment *epha4*, *trkb*, $GFR\alpha$, *nrp1*, *unc5b*, l'intégrine $\alpha3\beta1$, *erbb4*, *cxcr4* et *ackr3*). Lors de leur migration tangentielle, le cytosquelette d'actine participe à la dynamique du lamellipode et à l'avancée du noyau, celui de tubuline à la dynamique du processus conducteur et à l'avancée des organelles à l'avant du noyau dans une zone de gonflement au sein du processus conducteur. Ces dynamiques sont influencées par des signaux de l'environnement local, détectés par le lamellipode et le cil primaire. La fin de la migration tangentielle s'accompagne d'une modification de la réponse à ces signaux.

III. Migration radiaire et intégration des interneurons provenant de la MGE chez la souris

A. Entrée en migration radiaire

Bien connue chez les neuroblastes glutamatergiques, la migration radiaire l'est beaucoup moins chez les neuroblastes GABAergiques, probablement parce qu'un défaut de migration tangentielle ne permet pas d'étudier les étapes de développement ultérieures.

Nous avons déjà vu qu'à E15,5 les neuroblastes GABAergiques commencent à changer de comportement migratoire, certains allant dans la zone ventriculaires où ils restent stationnaires pendant quelques temps alors que d'autres ont un processus conducteur dans une direction oblique orientée vers la pie mère^{185,188}. A E16,5, les neuroblastes GABAergiques commencent à changer de direction de migration, pour migrer radialement par rapport à la zone ventriculaire et entrer dans la plaque corticale (vers la pie mère pour ceux du flux profond et vers la zone ventriculaire pour ceux de la zone marginale)²³⁵. Ce changement de direction se fait par l'établissement de nouveaux branchements orientés perpendiculairement aux flux de migration tangentielle^{176,182,189}. A E18,5, cela concerne 40% des neuroblastes GABAergiques qui sont dans la plaque corticale²³⁵. A ce stade, les neuroblastes GABAergiques de la zone marginale sont stationnaires, alors que tous les autres sont motiles³¹⁵. Les interneurons immatures ne sont plus motiles à P6-P7, indiquant qu'ils ont terminé leur migration radiaire^{256,315}.

Ces changements d'orientation des branchements, et donc la dynamique du cytosquelette, sont nécessaires à l'entrée des neuroblastes GABAergiques dans la plaque corticale. En l'occurrence, chez les mutants doubles homozygotes pour *Dlx1* et *Dlx2* déjà

mentionnés (**Partie IID**), les neuroblastes s'accumulent dans les flux de migration tangentielle.

J'ai déjà évoqué le fait que les neuroblastes GABAergiques contactent la glie radiaire à la fin de la migration tangentielle et que certains d'entre eux (27% dans le flux superficiel, 50% dans le flux profond) changent leur comportement suite à ces contacts¹⁸⁹. Ce changement de comportement, seulement pour certains à un endroit et à un temps donnés, peut amener à l'hypothèse séduisante que les neuroblastes GABAergiques possèdent des protéines d'adhérence cellulaire, de manière hétérogène, interagissant avec d'autres situées sur la glie radiaire, spécifiques d'une région corticale, guidant les neuroblastes GABAergiques dans une région donnée. Certains ont avancé l'hypothèse selon laquelle si des populations d'interneurones sont spécifiques de certaines corticales, alors le passage de la migration tangentielle à la migration radiaire devrait être impliqué dans cette spécificité³¹⁶.

Nous avons vu une étude montrant que les axones thalamo-corticaux ne seraient pas impliqués dans la migration tangentielle. La même étude a montré qu'en l'absence de ces axones (mutants homozygotes pour *Gbx2*), **la distribution laminaire** (à travers les couches néocorticale ou lamination) est anormale, avec une diminution du nombre d'interneurones dans les couches supérieures, et une augmentation dans les couches inférieures. Ce résultat indique une implication des axones thalamo-corticaux dans la migration radiaire. De plus, la transition de la migration tangentielle vers la migration radiaire semble être altérée. Le nombre de neuroblastes GABAergiques dont le processus conducteur est orienté de manière oblique par rapport au flux de migration tangentielle est plus faible en l'absence d'axones thalamo-corticaux et ces neuroblastes présentent une augmentation du nombre de branchements. Ce défaut est associé à des anomalies de transition entre les deux types de migration²⁷⁰. Nous verrons que le co-transporteur de potassium et de chlore **slc12a5 (kcc2)** est exprimé après la naissance (**Partie IIIB**). Il exporte les ions chlorure à l'extérieur des cellules, ce qui rend le GABA hyperpolarisant et les neuroblastes moins excitables. Les

auteurs de cette études proposent que les axones thalamo-corticaux, en sécrétant du glutamate, inhibent l'expression de *slc12a5* dans les neuroblastes GABAergiques et préviennent ainsi leur entrée en migration radiaire et la terminaison trop précoce de cette étape de migration²⁰⁰.

Il existe des populations transitoires embryonnaires de neurones glutamatergiques : la grande majorité **des cellules Cajal-Retzius** (sécrétant la reeline), **les neurones du sous-plateau** participant au développement et à l'adressage des axones thalamo-corticaux, ainsi que **les neurones transitoires de la plaque corticale**. Ces populations naissent dans le pallium et à la frontière entre le pallium et le subpallium. Elles migrent tangentiellement au sein du cortex, migration contrôlée de manière similaire à celle des neuroblastes GABAergiques, ce qui a pu entraîner dans un premier temps une confusion avec celle de ces derniers. Elles jouent un rôle important dans la régionalisation corticale ainsi que dans les connections thalamo-corticales³¹⁷. Il n'est donc pas impossible qu'elles jouent un rôle indirect dans le développement des interneurones. Il a par exemple été montré que les cellules Cajal-Retzius interviennent dans l'invasion de la plaque corticale par les neuroblastes GABAergiques : des défauts dans le développement des cellules Cajal-Retzius entraînent en effet des défauts de distribution des interneurones à travers les couches néocorticales^{247,318,319}.

Au moment de leur entrée en migration radiaire, les neuroblastes GABAergiques perdent leur réponse à *cxcl12*. Les neuroblastes GABAergiques entrent plus précocément dans la plaque corticale dans des embryons mutants homozygotes pour *Cxcr4*, indiquant que les neuroblastes GABAergiques cessent probablement d'exprimer *cxcr4* et/ou *ackr3* chez les embryons sauvage lorsqu'ils entrent en migration radiaire^{55,176,233,246}.

La **connexine GJa1 (cx43)**, protéine formant des jonctions communicantes (en anglais, *gap junctions*), est nécessaire pour une interaction entre les neuroblastes GABAergiques et la glie radiaire, son absence entraînant un retard dans le changement de

type de migration³²⁰. En ce qui concerne les neuroblastes glutamatergiques, il a été montré que ce sont les propriétés d'adhérence de GJa1 et non ses fonctions de héli-canal qui sont nécessaires à leur migration radiaire. GFa1 est exprimée le long du processus conducteur des neuroblastes glutamatergiques et interagit de manière homotypique avec la glie radiaire en des points d'adhérence^{171,321}. On peut imaginer que certaines protéines d'adhérence impliquées dans la migration tangentielle, comme ntn1 ou l'intégrine $\alpha3\beta1$, soient inhibées pour l'entrée dans la migration radiaire²⁶⁶.

En outre, l'entrée en migration radiaire semble être contrôlée par Sox6 car son absence entraîne une accumulation des neuroblastes GABAergiques dans la zone marginale.

Une étude récente a permis d'identifier les régulateurs principaux contrôlant l'entrée des neuroblastes GABAergiques dans la plaque corticale. Cette étude a considéré comme hypothèse que les neurones pyramidaux (en l'occurrence du cortex somatosensoriel) devraient surexprimer ces régulateurs au début de la migration radiaire et qu'ils devraient ne plus exprimer ces gènes à P4. Les auteurs ont ainsi identifié 42 gènes davantage exprimés par les neurones pyramidaux à E17,5 qu'à P4, en isolant les neurones pyramidaux par tri de cellules fluorescentes. Ils ont ensuite réalisé des hybridations *in situ* afin d'observer les profils d'expression de ces gènes. L'un des gènes fortement exprimé dans la plaque corticale est celui codant pour la **neuréguline-3 (nrg3)**, qui se lie à erbb4. Les auteurs ont observé que *Nrg3* est exprimé dans les neuroblastes glutamatergiques dès leur entrée dans la plaque corticale, puis que son expression est maintenue dans toutes les couches néocorticales aux stades matures. Des co-cultures *in vitro* indiquent que nrg3 n'est pas un chémoattractant à longue distance, contrairement à IG-nrg1. Nrg3 est un chémoattractant à courte distance, comme l'est CRD-nrg1. Nous avons vu que les neuroblastes GABAergiques sont attirés par cxcl12 le long des voies de migration tangentielle. Dans cette étude, les neuroblastes GABAergiques sont attirés par cxcl12 et nrg3 mais avec une plus grande affinité pour cxcl12, ce qui explique pourquoi ils restent dans les flux de migration

tangentielle à des stades précoces. En revanche, la surexpression de *Nrg3* suite à une électroporation accélère l'entrée des neuroblastes GABAergiques dans la plaque corticale. Il est donc probable que lorsque les neuroblastes GABAergiques perdent leur réponse à *cxcl12* (perte d'expression de *cxcr4* et *ackr3*), ils sont ensuite attirés vers la plaque corticale riche en *nrg3*. En l'absence de *nrg3*, le nombre d'interneurones est normal aux stades matures mais leur lamination ne l'est pas. Il y a en effet plus d'interneurones dans les couches supérieures. Des résultats similaires sont obtenus en l'absence d'expression d'*ErbB4*. Les interneurones nés à E12,5 sont davantage localisés dans la couche V que dans la couche VI et les interneurones nés à E15,5 sont davantage localisés dans les couche II/III que dans la couche IV. Ces observations suggèrent que *nrg3* est détecté par *erbB4* et exprimé par les neuroblastes GABAergiques lorsqu'ils sont en transition entre la migration tangentielle et radiaire (**Figure 12**). Les autres gènes dont l'expression est fortement modifiée dans les neurones pyramidaux entre E17,5 et P4 sont ceux codant, par exemple, pour des récepteurs aux éphrines (*epha6*, *epha10*, *ephb2*, *ephb3*), des éphrines (*efna5*), des plexines (*plxndc2*, *plxna1*, *plxnd1*), des protocadhérines δ (***pcdh8***, ***pcdh9***, *pcdh11x*, ***pcdh20***), et des sémaphorines (*sema7a*). Leur rôle dans la migration radiaire reste encore à être précisé³²².

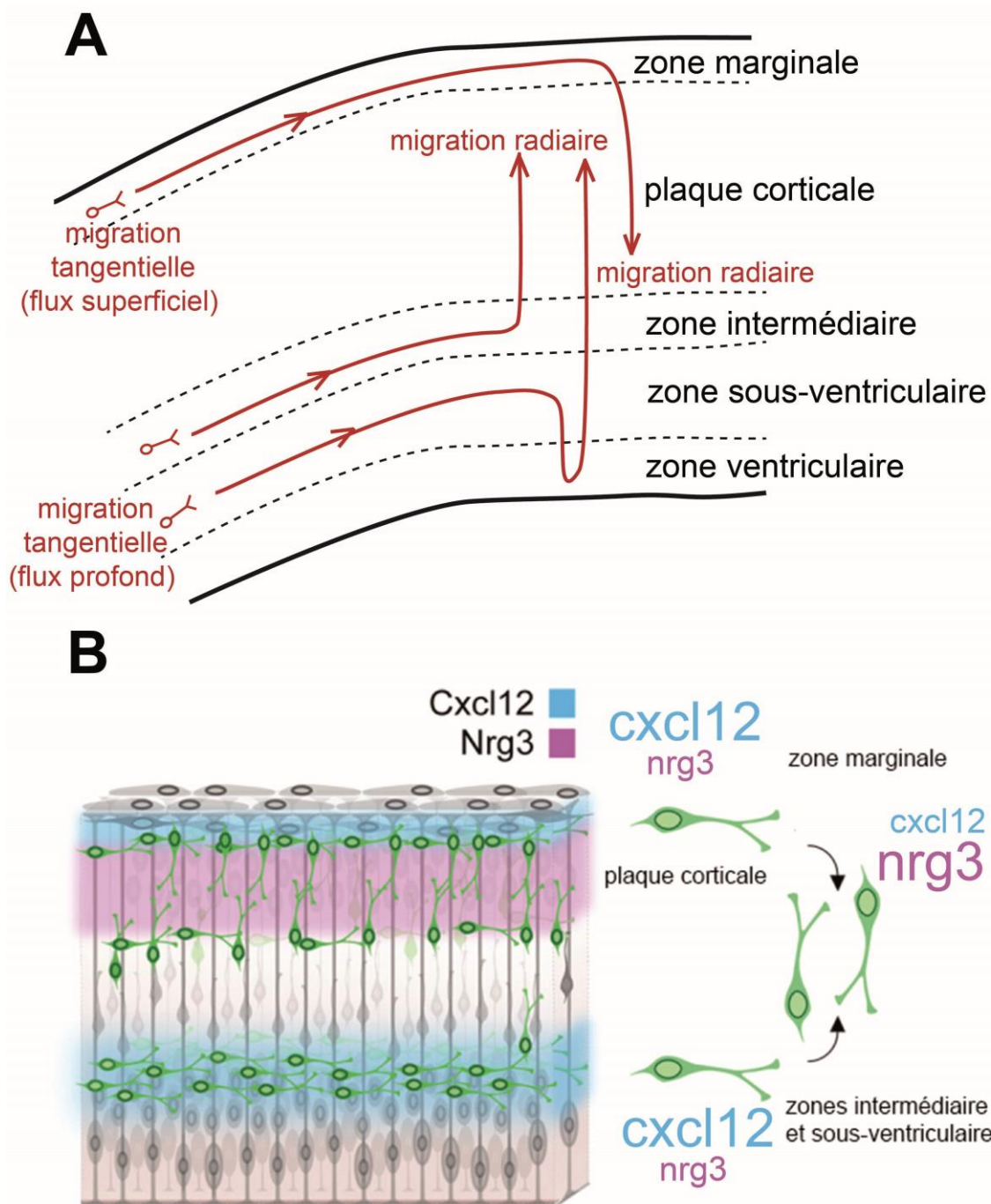


Figure 12 Migration radiale des neuroblastes GABAergiques. **A**, Les neuroblastes des deux flux de migration tangentielle envahissent la plaque corticale vers E18,5 en changeant d'orientation de migration. **B**, Mécanisme proposé de transition entre les deux types de migration faisant intervenir nrg3 : les neuroblastes détectent cxcl12 le long du flux de migration tangentielle via cxcr4 et ackr3. Suite à la perte de ces récepteurs, ils entrent dans la plaque corticale en détectant nrg3 via erbb4. **B** adapté de Bartolini *et al.*, 2017³²².

B. Fin de la migration et intégration des interneurons immatures dans des réseaux neuronaux

A la fin de la première semaine postnatale, les neuroblastes GABAergiques ont quitté définitivement les couches autres que la plaque corticale, couches qui elles-mêmes se résorbent, pour occuper leur position finale dans les six couches néocorticales. A P5, ils occupent leur couche finale¹⁴¹. Les interneurons nés à E12,5 occupent déjà tous la plaque corticale vers P0-P1¹⁴¹. Nous avons vu qu'à la fin de cette première semaine postnatale, ils ne sont plus motiles.

Des greffes hétérochroniques et isochroniques d'interneurons révèlent une motilité similaire des neuroblastes GABAergiques en migration à un temps donné après la greffe. Cela suggère l'existence d'une « horloge interne » des neuroblastes GABAergiques qui deviendraient sensibles aux signaux d'entrée en migration radiaire^{55,58,235,256,323}. Il a été proposé que *slc12a5*, peu exprimé pendant la migration tangentielle, est fortement exprimé par les neuroblastes GABAergiques une semaine après leur entrée dans le cortex et au moins une semaine avant les neurones pyramidaux¹⁴¹. *Slc12a5* induit la sortie en dehors des cellules des ions chlorures. Il s'ensuit une modification du potentiel électrochimique des ions chlorures entraînant une inversion de l'effet du GABA. Le GABA n'est plus excitateur (dépolarisant) mais devient inhibiteur (hyperpolarisant)³²⁴. Or, une hyperpolarisation (ce qui est le cas lors de l'administration de GABA en présence de *slc12a5*) diminue la motilité des neuroblastes GABAergiques. Il est donc possible que le GABA stoppe la migration des neuroblastes GABAergiques en induisant leur hyperpolarisation grâce à l'expression de *slc12a5*.

Nous avons vu que les interneurons nés aux stades précoces occupent les couches néocorticales profondes alors que ceux nés aux stades plus tardifs occupent les couches néocorticales superficielles. Il semblerait que cette répartition soit liée à celle des neurones pyramidaux. En effet, chez les mutants *reeler*, qui ne synthétisent pas la reeline, la

distribution des neurones pyramidaux est incorrecte tout comme celle des interneurons. Il n'est donc pas impossible que les neurones pyramidaux produisent des facteurs attractants permettant aux interneurons de bien se positionner^{143,316,318,323}. Ces facteurs pourraient dépendre de l'activité neuronale locale, c'est-à-dire de la libération du glutamate et du GABA dès la mise en place des premiers réseaux neuronaux^{256,325}. Le glutamate et le GABA dans l'environnement local réguleraient l'expression de *slc12a5* et ainsi la fin de la migration^{316,326}. Dans ce dernier cas, les interneurons ne se distingueraient pas par des protéines d'adhérence, mais seulement par leur date de naissance qui les rendrait réceptifs à ces facteurs à un moment donné.

La maturation des interneurons se poursuit par une augmentation de l'expression de deux décarboxylases de l'acide glutamique (GAD) qui permettent la synthèse du GABA : **GAD1 (GAD67)** qui est surtout exprimée dans le corps cellulaire, et **GAD2 (GAD65)** qui est surtout exprimée au niveau des connexions synaptiques. L'expression de ces deux enzymes augmente jusqu'à la puberté (soit environ un mois après la naissance), suggérant une maturation des interneurons jusqu'au moins ce stade. En parallèle, l'expression des transporteurs du GABA (GAT) ***slc6a1 (GAT1)*** et ***slc6a13 (GAT3)*** augmente, permettant l'entrée du GABA dans les vésicules synaptiques⁵⁶ (**Figure 13**).

Qu'en est-il des synapses GABAergiques, signe de l'intégration des interneurons immatures dans le réseau neuronal néocortical ? Les premières connexions synaptiques sont visibles dès E16,5 et les premières réponses synaptiques vers E18,5. A ce stade, environ 65% des interneurons immatures induisent des courants postsynaptiques inhibiteurs. La fréquence des réponses postsynaptiques GABAergiques spontanées augmente pendant le premier mois postnatal, reflétant l'augmentation de l'expression des GAD et des GAT. Dans le même temps, les interneurons immatures complètent leur maturation en développant leurs **neurites** (dendrites, axones) ainsi que leurs propriétés électrophysiologiques⁵⁶. Par ailleurs, il a été montré que les interneurons forment des **synapses électriques** entre eux, ce qui permet la synchronisation de leur activité³²⁷⁻³²⁹.

La maturation de l'inhibition corticale dépend non seulement de la maturation des interneurons mais aussi de la réponse des neurones glutamatergiques au GABA. Par exemple, à la naissance, ces derniers expriment peu *slc12a5* par rapport à *slc12a2* : il y a une accumulation d'ions chlorures au sein des cellules, ce qui rend le GABA excitateur. L'expression de *slc12a5* augmente à la fin de la première semaine postnatale, rendant le GABA inhibiteur. Pendant le premier mois postnatal, les rapports d'expression des sous-unités des récepteurs GABA_A et GABA_B changent, de même que les rapports d'expression des sous-unités des récepteurs au glutamate changent dans les interneurons immatures⁵⁶.

Réciproquement, la maturation des interneurons dépend des synapses que font les neurones glutamatergiques avec eux. Au cours de la première semaine postnatale (à partir d'environ P5), les interneurons de la couche IV du cortex auditif commencent à recevoir des synapses glutamatergiques avec des neurones glutamatergiques locaux. Des neurones glutamatergiques des autres couches néocorticales commencent à faire des synapses avec les interneurons au cours de la seconde semaine postnatale³³⁰.

J'aborderai le rôle fonctionnel des interneurons en prenant l'exemple du cortex auditif dans la discussion (**Discussion Partie IIB**).

C. Programme apoptotique et maturation des neuroblastes GABAergiques en interneurons

Il est connu qu'au cours du développement un nombre excédentaire de neurones est produit et qu'une période d'apoptose permet d'éliminer ces neurones excédentaires³³¹. Une étude s'est intéressée à l'expression de la forme activée de la **caspase-3 (casp3)**, opérant une des voies apoptotiques, dans les interneurons immatures (exprimant la protéine fluorescente verte GFP). Le résultat était le suivant. Le nombre d'interneurons immatures exprimant *casp3* augmente au cours de la première semaine postnatale atteignant un

nombre maximum à P7, puis décline pour devenir nul autour de P15. La plupart d'entre eux (75%) sont détectés entre P7 et P11 (**Figure 13**). La proportion d'interneurones immatures qui entrent en apoptose est d'environ 40%. Les mêmes auteurs se sont demandé si l'entrée en apoptose dépendait d'un programme intrinsèque aux interneurones. Ils sont partis du principe que les interneurones entrent en apoptose entre P11 et P18 *in vivo*. Ils ont placé des neuroblastes issus de MGE à E13,5 sur des tranches corticales issues d'animaux à P0-P2. Si l'entrée en apoptose était dépendante de facteurs de l'environnement local, une entrée en apoptose aurait débuté après 7 à 11 jours de culture. Or 66% d'entre eux sont entrés en apoptose après 11 à 15 jours de cultures *in vitro*, soit avec la même temporalité qu'*in vivo*. Des résultats qui vont dans le même sens sont obtenus si la transplantation a lieu à P3 et les auteurs ont pu montrer que l'expression par les interneurones immatures du récepteur au BDNF, *trkb*, n'est pas nécessaire à leur entrée en apoptose. Ces résultats sont donc en faveur de l'existence d'un programme intrinsèque aux interneurones conduisant à l'élimination de 40% d'entre eux. En revanche, la nature des interneurones éliminés et les mécanismes conduisant à leur entrée en apoptose restent à être élucidés³³². Une hypothèse séduisante serait que comme les interneurones immatures sont en pleine synaptogenèse pendant les premières semaines postnatales, les interneurones éliminés seraient ceux qui ne parviennent pas à former de connexions synaptiques³¹⁶. On pourrait imaginer deux raisons à leur absence d'intégration : soit une compétition entre les interneurones immatures (considérés comme équivalents) et un nombre limite de connexions synaptiques possibles, soit seuls certains interneurones immatures possèdent les protéines d'adhérence nécessaires à leur intégration dans certaines aires corticales.

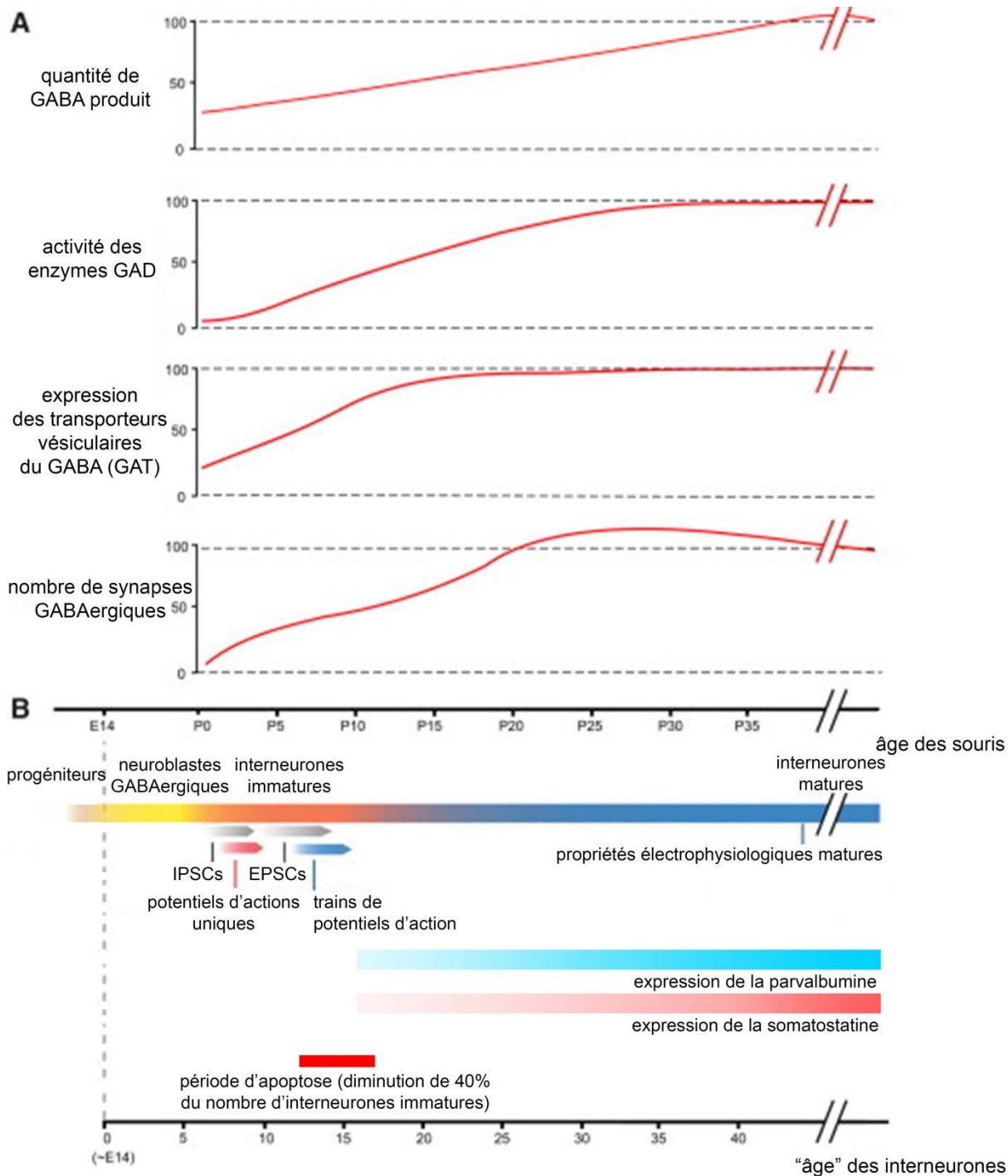


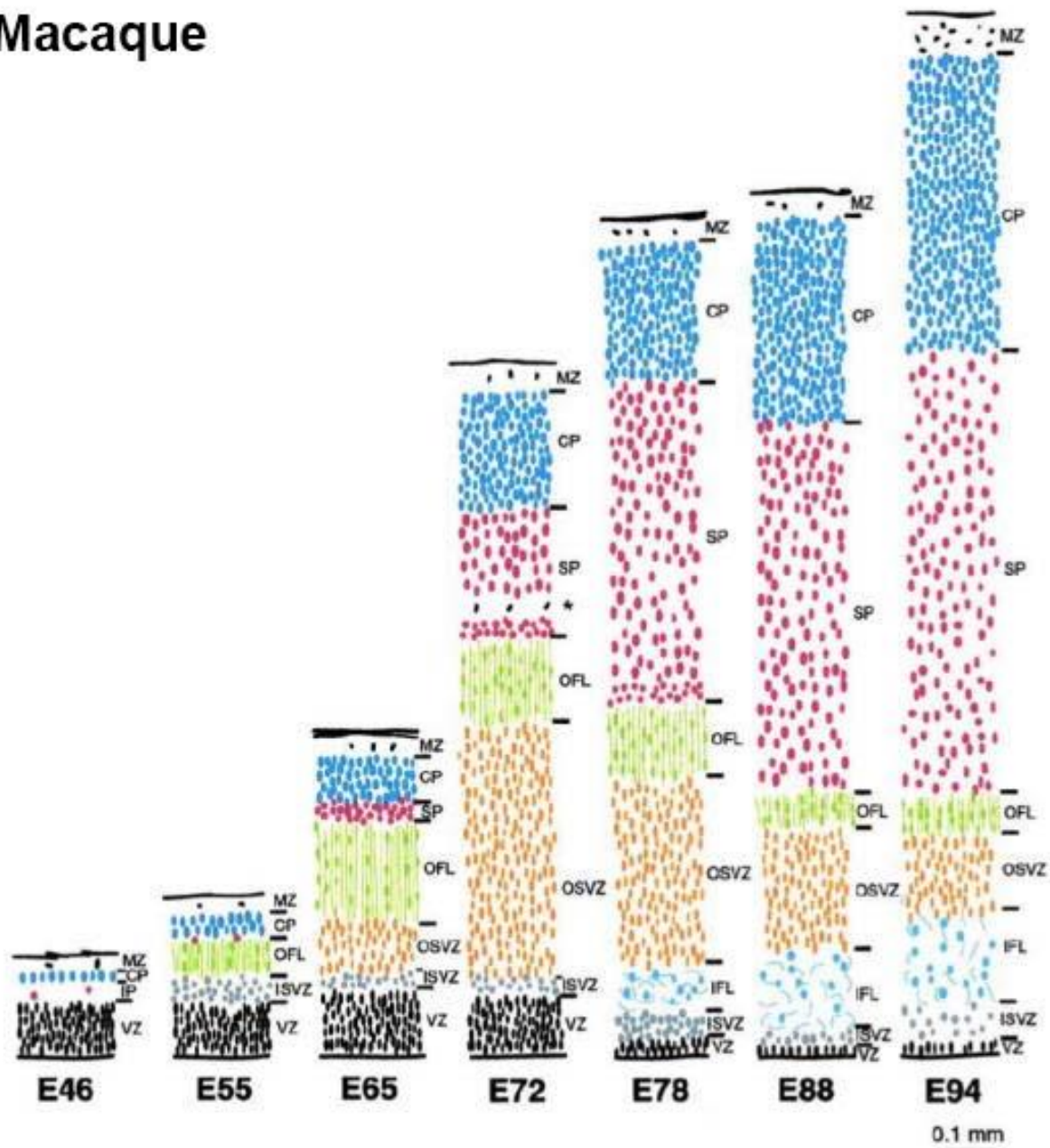
Figure 13 Développement postnatal des interneurons. **A**, Expression de marqueurs d'interneurons après la naissance. **B**, Maturation fonctionnelle (électrophysiologique, marqueurs moléculaires parvalbumine et somatostatine) des interneurons après la naissance. Entre P5 et P15 (surtout entre P7 et P11), 40% des interneurons immatures entrent en apoptose. Abréviations : courants post-synaptiques inhibiteurs (**IPSCs**) et excitateurs (**EPSCs**). Adapté de Le Magueresse & Monyer, 2013⁵⁶, cf. Southwell *et al.*, 2012³³² et Ouellet & de Villers-Sidani, 2014⁸⁹.

En conclusion, les neuroblastes GABAergiques entrent en migration radiaire aux alentours de E15,5 (ceux du flux profond en premier) puis se distribuent dans les couches néocorticales (lamination). Ils entrent en migration radiaire en interagissant avec la glie radiaire, les axones thalamo-corticaux ainsi que les neuroblastes glutamatergiques. Les molécules impliquées dans ce changement de type de migration sont encore mal connues. Les neuroblastes GABAergiques perdent ensuite leur motilité au cours de la première semaine postnatale, notamment en exprimant *slc12a5* (qui rend les cellules moins excitables), et commencent leur synaptogenèse. Au cours des deux premières semaines postnatales, 40% des interneurones immatures entrent en apoptose. Il faudra attendre P40 pour qu'ils deviennent pleinement matures, intégrés de manière fonctionnelle à un réseau neuronal et exprimant toutes les molécules qui permettent leur fonction. Leur maturation est dépendante de l'environnement et est cruciale à la physiologie de l'aire corticale à laquelle ils appartiennent.

IV. Développement des interneurons chez les primates

Chez le macaque (*Macaca fascicularis*), la gestation est d'environ 160 jours (23 semaines) et la corticogenèse a lieu entre E40 et E100 (soit entre GW5 et GW14). Chez l'humain, la gestation est d'environ 266 jours (38 semaines) et la corticogenèse a lieu entre GW5 et GW30³¹. En ce qui concerne l'anatomie corticale, le sous-plateau est beaucoup plus développé chez les primates et une nouvelle couche proliférative apparaît dans la zone superficielle de la zone ventriculaire corticale : **la zone sous-ventriculaire externe corticale**. Cette couche est également présente chez le furet, elle est donc probablement commune aux primates et aux carnivores^{333,334}. La prolifération cellulaire y est importante entre GW7 et GW13 chez le macaque (en extrapolant, entre GW14 et GW29 chez l'humain)^{333,334}. Cette zone, qui contient aussi des cellules de la glie radiaire, est celle qui contribue le plus à la corticogenèse, notamment à la production des neurones glutamatergiques des couches superficielles. La zone ventriculaire cesse en effet rapidement son activité proliférative^{333,334} (**Figure 14**).

Macaque



Souris

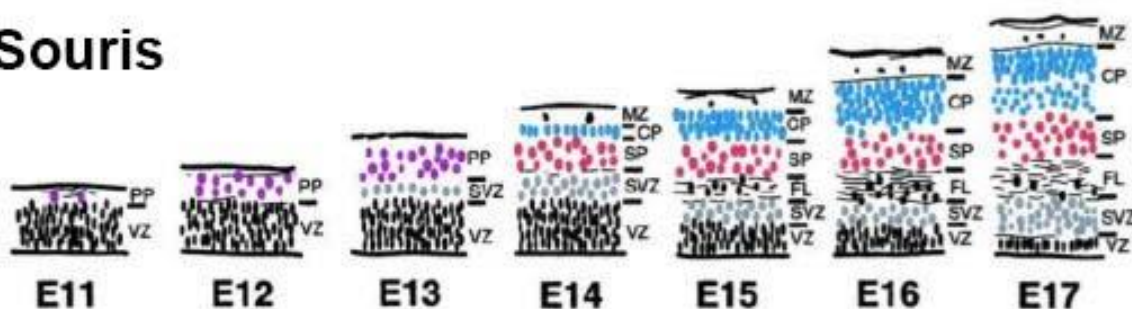


Figure 14 Développement cortical embryonnaire chez la souris et le macaque. Dessins représentant des coupes transversales de cortex embryonnaire (aire putative 17, dans le cortex visuel, chez le singe) et l'équivalent chez la souris, à des stades analogues, à la même échelle. Abréviations : plaque corticale (CP, pour cortical plate), pré-plateau (IP ou PP), zone fibreuse externe (OFL), zone sous-ventriculaire interne (ISVZ), zone ventriculaire (VZ), sous-plateau (SP), zone sous-ventriculaire externe (OSVZ), couche fibreuse interne (IFL). Issu de Molnár *et al.*, 2006³³⁵, adapté de Smart *et al.*, 2002³³⁶.

Le cortex des primates comporte une proportion plus élevée d'interneurones par rapport à celui des rongeurs : 25% chez le macaque contre 15% chez les rongeurs. Cette proportion peut monter jusqu'à 34-44% dans certaines couches superficielles chez l'humain^{25,26,337-343}. Il contient en plus d'autres types d'interneurones qui ne sont pas présents chez les rongeurs, comme les interneurones en double panier et des interneurones en couche I³⁴⁴. Ces types d'interneurones pourraient avoir pour origine un groupe de progéniteurs qui n'existe pas chez les rongeurs et qui est présent au sein du cortex des primates dans la zone sous-ventriculaire externe corticale (ces progéniteurs ne seraient pas présents chez le furet). Le meilleur argument en faveur de l'existence de ces progéniteurs GABAergiques corticaux est l'expression d'*Asc1* dans des progéniteurs de cette couche, qui par ailleurs expriment *Dlx1* et *Dlx2* ainsi que du GABA, alors qu'*Asc1* est chez les rongeurs un marqueur des progéniteurs du subpallium³⁴⁵. Il a aussi été montré chez l'humain à partir de tranches de cortex, que les progéniteurs apicaux corticaux donnent à la fois des lignages glutamatergiques et des lignages GABAergiques (ils expriment *Asc1*). De plus, une étude transcriptomique a détecté l'expression de marqueurs de progéniteurs d'interneurones dans cette zone^{25,333,346}. Cette zone pourrait produire 60% des interneurones^{337,344,345,347,348}. Cependant, une autre étude apporte des résultats contradictoires : aucune détection de cellules prolifératives exprimant *nkx2.1* dans le cortex (à GW11 chez le singe et à GW18-GW24 chez l'humain) et aucune détection *in vitro* de neuroblastes GABAergiques dans des tranches corticales de macaque à E55 (GW8) cultivées pendant 6 jours³⁴⁹. Notons que le contrôle du cycle cellulaire est différent chez les primates : par exemple, la cycline-D2 est surtout exprimée dans la zone ventriculaire (au lieu de la cycline-D1 chez les rongeurs) et la zone sous-ventriculaire^{124,125}.

Les éminences ganglionnaires des primates présentent des motifs d'expression pour *gsx2*, *ascl1*, *nkx2.1*, *sox6* et **nr2f2** (ou **coup-tf2**, facteur de transcription spécifique de la CGE) semblables à ceux des rongeurs^{173,349} (**Figure 15**). En ce qui concerne les contributions relatives de la MGE et de la CGE, les données sont contradictoires. Ces études ont mesuré les proportions relatives d'interneurones à parvalbumine et à calbindine-2. Chez

les rongeurs, les premiers sont surtout issus de la MGE et les seconds de la CGE. Une étude indique que le nombre d'interneurones à calbindine-2 serait relativement plus important chez les primates (8% des neurones) que chez les rongeurs (4% des neurones), suggérant une participation moindre de la MGE à la population totale d'interneurones^{343,350}. Cependant, si on rapporte ces proportions au nombre d'interneurones qui est plus important chez l'humain, les proportions ne sont pas si différentes : 32% chez l'humain et 27% chez le rat. Une autre étude rapporte une grande variabilité entre les régions corticales : d'un rapport de 1 interneurone à parvalbumine pour 0,75 à calbindine-2 chez les rongeurs, ce rapport passe chez l'humain à 1 pour 1 (1 pour 0,9 chez le singe) dans le lobe frontal, à 1 pour 0,37 (1 pour 0,32 chez le singe) dans le lobe occipital et à 1 pour 0,45 (1 pour 1,4 chez le singe) dans le lobe temporal, où est situé le cortex auditif³⁴⁹. Cependant, les interneurones à parvalbumine et à calbindine-2 étant générés aussi *a priori* dans le cortex, ces résultats ne permettent pas de conclure quant à la participation relative des deux éminences ganglionnaires. En revanche, il apparaît que la moitié des interneurones (en tout cas des neurones qui expriment *dlx2*) expriment *nr2f2* (non exprimé dans les progéniteurs de la zone sous-ventriculaire externe corticale), soit davantage que chez les rongeurs, chez qui cette proportion représente plutôt un tiers. Ainsi, les proportions relatives des interneurones à parvalbumine et à calbindine-2 varient en fonction des aires corticales et la CGE contribuerait davantage que la MGE chez les primates à la production des interneurones (50% au lieu de 30% chez les rongeurs)¹⁷³.

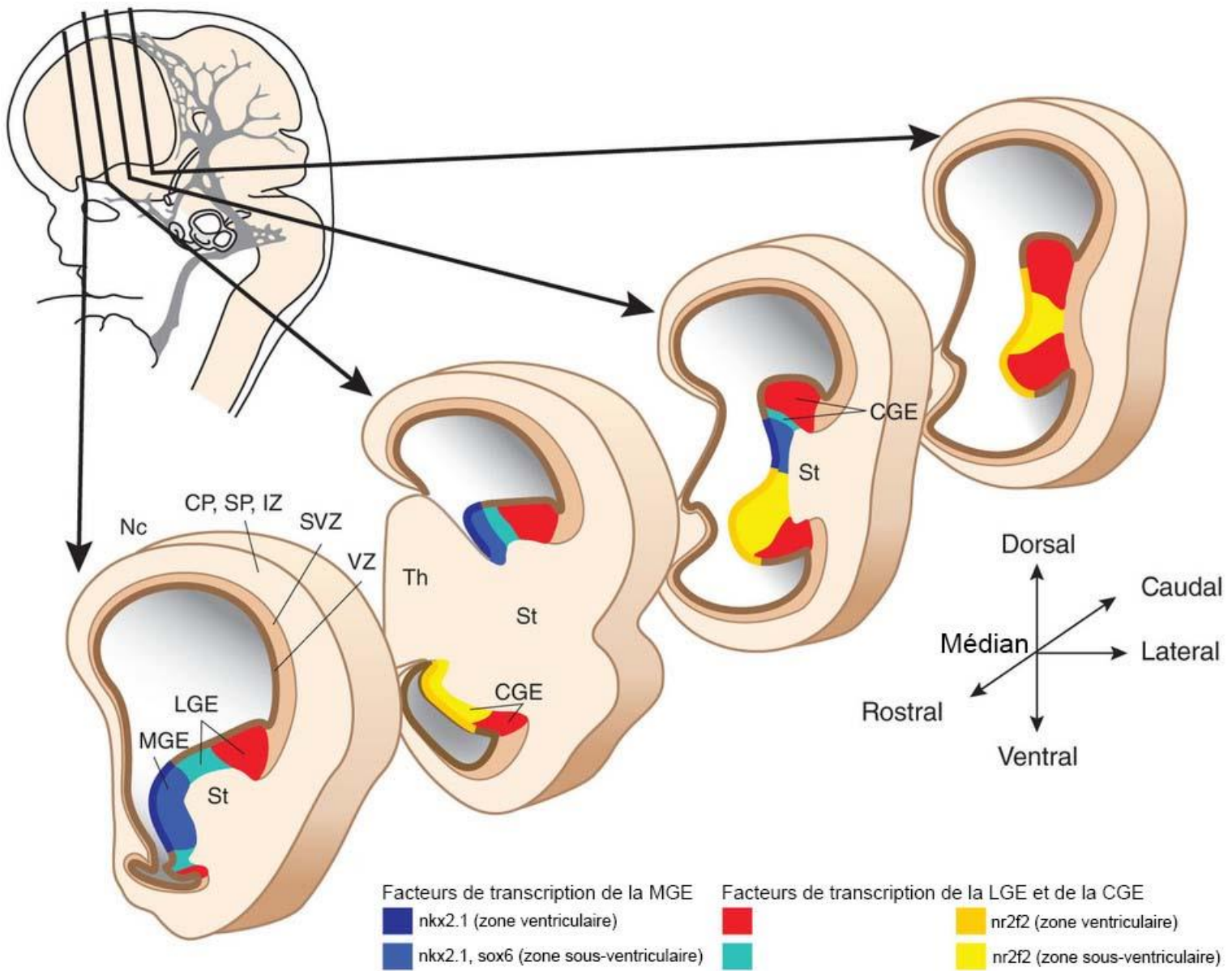


Figure 15 Profils d'expression des facteurs de transcription des éminences ganglionnaires chez l'embryon humain à 15 semaines de gestation. Différents plans de quatre sections coronales selon l'axe antéro-postérieur représentant les profils d'expression conservés chez le macaque de nkx2.1 et sox6 (facteurs de transcriptions de la MGE chez la souris, en bleu), de facteurs de transcription de la LGE (en rouge et vert) et de nr2f2 (facteur de transcription de la CGE chez la souris, en jaune). Abréviations : néocortex (Nc), sous-plateau (SP), striatum (St), thalamus (Th). Issu de Molnár & Butt, 2013³⁵¹.

En ce qui concerne la temporalité du développement des interneurones, ceux provenant des éminences ganglionnaires sont générés en début de gestation (entre E47 et E80 - GW7-GW11 - chez le singe et entre GW8 et GW14 chez l'humain). En effet, des neuroblastes GABAergiques en migration tangentielle entre les éminences ganglionnaires et le cortex et au sein du cortex (dans toutes les zones excepté la zone ventriculaire) sont observables entre GW10 et GW24 chez l'humain^{173,349}. Ceux nés dans la zone sous-ventriculaire externe corticale seraient générés en fin de gestation. Aucun progéniteur d'interneurone n'est observé dans la zone sous-ventriculaire externe corticale à E55 (GW8) chez le singe et à GW15-GW24 chez l'humain. En fonction des études, des progéniteurs

d'interneurones sont observés à E64-E75 (GW9-GW11) chez le singe et à GW20 chez l'humain^{173,337,344,345,347-350}. Les débats sur la contribution des différents lieux de génération d'interneurones et sur la proportion de chaque type est probablement dépendante des stades d'étude et des régions corticales étudiées.

J'ai évoqué chez les rongeurs l'existence de la voie de migration rostrale, de la LGE chez l'embryon et des ventricules latéraux après la naissance, vers les bulbes olfactifs. Chez l'humain, après la naissance, une partie des neuroblastes de la voie de migration rostrale migrent le long d'une autre voie de migration, la **voie de migration médiale**, pour aller peupler le cortex préfrontal médial, qui comprend les cortex cingulaire antérieur, infralimbique et prélimbique (impliqués dans les fonctions autonomes, la régulation des émotions, le conditionnement, la prise de décision). Ces neuroblastes sont GABAergiques. Ils sont observés trois mois après la naissance mais ce n'est plus le cas dans des cerveaux d'enfants après 6 ans³⁵².

En conclusion, les éminences ganglionnaires chez les primates s'organisent, en termes de profils d'expression de leurs facteurs de transcription, de manière analogue à celle des rongeurs, avec comme différence une contribution de la CGE probablement plus importante. S'ajoute chez les primates la genèse d'interneurones dans le néocortex, qui pourrait contribuer davantage que les éminences ganglionnaires. Cette nouvelle source d'interneurones serait à l'existence d'une plus grande proportion d'interneurones ainsi que de nouveaux types d'interneurones. En ce qui concerne la proportion d'interneurones à parvalbumine et à calbindine-2, il semble qu'elle varie en fonction des régions cérébrales (elle serait semblable dans le cortex auditif des rongeurs et de l'humain). J'aborderai les pathologies neurologiques associées aux interneurones ainsi que de potentiels thérapies consistant en des transplantations d'interneurones dans la discussion (Discussion Partie IIC).

V. Protéines d'adhérence et développement des interneurons

Nous avons déjà rencontré plusieurs protéines d'adhérence cellulaire au cours de l'introduction (**Parties IIB-D et IIIA**) : notamment, une cadhérine de type I (cdh2), des cadhérines de type II (cdh8, cdh10), cdh13, une cadhérine de type flamingo appartenant aussi à la famille des aGPCRs (CELSR3 ou adgrc3), des protocadhérines δ (pcdh8, pcdh9, pcdh11x, pcdh20), des protéines appartenant à la famille des immunoglobulines (NCAM1), la connexine GJA1, la contactine cntn2. J'ai déjà discuté leur potentiel rôle et leur régulation à l'échelle cellulaire (**Partie IID**).

Dans les études de transcriptomique dans la MGE (cellules uniques ou tissu entier) citées dans les parties précédentes^{106,136,137}, un faible nombre de protéines d'adhérence a été détecté et en faible quantité (je me suis intéressé aux cadhérines, protéines apparentées aux cadhérines, protocadhérines et aGPCRs). Ces résultats sont donc à prendre à titre indicatif (par exemple, une protéine peut être présente et jouer un rôle majeur mais être traduite à partir de peu d'ARNm qui sera d'autant plus difficile à détecter). Les protéines détectées sont des aGPCR (adgrv1, **CELSR1** à **CELSR3** dont CELSR1 ou **adgrc1** à **adgrc3** dont adgrc1), des cadhérines de type I (cdh1 à cdh4 dont cdh2, cdh15), des cadhérines de type II (cdh5 à cdh12, cdh18 à cdh20 dont cdh18, cdh22, cdh24), cdh13, cdh26, des cadhérines à sept domaines transmembranaires (cdh16, cdh17), des protéines apparentées aux cadhérines (cdhr15 ou pcdh15, cdhr23 ou cdh23, FAT1 à FAT3 ou cdhr8 à cdhr10), des protocadhérines non regroupées (en anglais, *clustered*) ou de type δ (pcdh1, pcdh7 à pcdh12, pcdh17 à pcdh20) et les protocadhérines regroupées (de type α , β et γ).

La plupart de ces protéines ont été associées à des troubles neurologiques comme la **schizophrénie, l'autisme, l'épilepsie et des troubles bipolaires** (elles sont soulignées dans les deux paragraphes précédents, **cf. Discussion Partie IIC**)³⁵³⁻³⁶¹. Je me concentrerai sur les familles de protéines dont le rôle a été montré dans le développement des interneurons (ou que j'ai étudiées pendant ma thèse) : les cadhérines de type I, cdh13, les protéines apparentées aux cadhérines et les aGPCRs.

A. Rôles des cadhérines dans le développement du système nerveux central, et en particulier celui des interneurons

Il existe 18 cadhérines classiques caractérisées par un domaine transmembranaire, 5 répétitions du **domaine extracellulaire de type cadhérine (EC)** dont la topologie ressemble à celle des domaines immunoglobuline, et des domaines intracellulaires interagissant avec les caténines **ctnnd1** (p120) et **ctnnb1**, qui opèrent la signalisation intracellulaire dépendante des cadhérines et qui peuvent interagir avec le cytosquelette d'actine. En fonction de la séquence du domaine EC, les cadhérines se regroupent en cadhérines de type I (5 cadhérines : cdh1 ou E-cadhérine, cdh2 ou N-cadhérine, cdh3 ou P-cadhérine, cdh4 ou R-cadhérine et cdh15 ou M-cadhérine) ou de type II (13 cadhérines : cdh5 à cdh12, cdh18 à cdh20, cdh22, cdh24). De plus, les cadhérines de type I présentent un tryptophane en position 2, les cadhérines de types II deux tryptophanes en position 2 et 4, ce qui permet la formation d'une poche hydrophobe. Les cadhérines classiques sont spécifiques aux vertébrés, certaines d'entre elles étant présentes chez tous les vertébrés (4 cadhérines de type I et 9 cadhérines de type II).

Les cadhérines ont des propriétés d'adhérence cellulaire dépendantes du calcium, dans des configurations en *cis* ou en *trans*. Entre deux domaines EC voisins, trois domaines de fixation des ions calciques permettent de rigidifier les connexions entre ces domaines, ce qui entraîne une courbure de la partie extracellulaire des cadhérines. La

rigidité de la partie extracellulaire des cadhérines permet des interactions avec d'autres cadhérines ancrées à une membrane opposée (interaction en *trans*), en alignant en parallèle les premiers et deuxièmes domaines EC des cadhérines qui interagissent (domaines EC1 et EC2). Deux cadhérines classiques qui interagissent s'échangent un brin β : chaque cadhérine a deux conformations possibles, avec soit ce brin β dans la poche hydrophobe de sa cadhérine soit dans la poche du premier domaine EC de la cadhérine d'interaction. Les cadhérines de type I se lient de manière homophile et forment un homodimère, avec une affinité pour la dimérisation variable ; des hétérodimères sont possibles, avec une affinité intermédiaire, par exemple entre cdh1 et cdh2. Les cadhérines de type II peuvent aussi former des homodimères et des hétérodimères³⁶²⁻³⁶⁶. D'autres formes d'interactions existent : des dimères en X ainsi qu'en *cis*, notamment aux jonctions d'adhérence (à ce moment-là entre la base du domaine EC1 d'une cadhérine et l'apex du domaine EC2 de l'autre)³⁶⁶. Par ailleurs, les cadhérines classiques peuvent interagir avec d'autres types de protéines d'adhérence, comme cdh2 avec pcdh19³⁶⁷.

Au cours du développement du système nerveux central des vertébrés, les cadhérines participent à de nombreuses fonctions. Elles participent à la **neurogenèse** (les cadhérines comme cdh2, par exemple, régulent la prolifération, la préservation d'une identité de progéniteur notamment en formant des jonctions d'adhérence de 10-30 nm au sein du neuroépithélium), **la différenciation des neuroblastes et leur migration**, **la polarité neuronale** (au sens large, de l'organisation asymétrique du neurone avec un compartiment axonal et un compartiment dendritique, la localisation asymétrique d'organelles), **la formation d'axones** (le regroupement de cdh1 et cdh2 au sein du neurone immature permet le bon positionnement du centrosome et le développement du futur axone), **la formation de circuits** (par exemple, cdh8 et cdh9 sont exprimées dans des cellules bipolaires distinctes dans la rétine, permettant ainsi des connexions synaptiques avec des neurones localisés dans des couches différentes ; les motoneurones expriment quatre cadhérines différentes – cdh6b, cdh8, cdh13 et cdh20, et les motoneurones qui connectent un muscle particulier se

rassemblent après leur migration en un groupe de neurones exprimant la même combinaison de cadhérines), **la synaptogenèse** et **la survie cellulaire**^{362,368,369}.

Plus particulièrement, en ce qui concerne la polarité cellulaire, le développement neuronal comprend trois processus l'impliquant : au moment de la naissance des neurones (les divisions peuvent être symétriques ou asymétriques), **de leur migration** (dans une direction donnée plutôt qu'une autre ce qui induit une polarité cellulaire dans le sens de migration) **et au moment de leur différenciation** (compartiment dendritique versus compartiment axonal). Les cadhérines participent à la détection d'informations (d'adhérence) extérieures à la cellule et à la transduction de ces informations en contrôlant la polarité cellulaire. Par exemple, les cadhérines classiques (cdh1, cdh2) participent à l'établissement du neuroépithélium de la zone ventriculaire en intervenant dans les jonctions d'adhérence et le positionnement du centrosome (nous avons vu que le centrosome participe à la formation des prolongements de la glie radiaire). Cdh2 participe à la polarisation du neuroblaste et à la croissance du neurite, notamment en contrôlant le positionnement du centrosome et de l'appareil de Golgi. Je décrirai ci-dessous comment cdh2 participe à la migration tangentielle des neuroblastes GABAergiques en les guidant de la MGE vers le néocortex³⁷⁰.

En ce qui concerne la synaptogenèse, les synapses ne se formeraient pas de manière aléatoire. En effet, les neurones forment parfois des connexions synaptiques avec des partenaires privilégiés. Par exemple, les interneurones à VIP contactent d'autres interneurones plutôt que des neurones pyramidaux. Les interneurones, en fonction de leur type et sous-type, ne forment pas leurs connexions synaptiques avec leurs neurones cibles au niveau du même compartiment (dendrites, corps cellulaire, segment axonal initial). Si ces aspects sont bien connus, les règles moléculaires qui sous-tendent ces spécificités synaptiques le sont moins. Une hypothèse concernant la synaptogenèse (déjà décrite au cours de cette introduction) propose que l'activité locale puisse inciter les interneurones à s'intégrer dans un réseau. D'autre part, les protocadhérines regroupées, localisées à la

synapse, participent très probablement à la synaptogenèse. 58 gènes codants pour des protocadhérines regroupées existent, regroupés dans le génome en trois groupes (α , β et γ) et les neurones pourraient exprimer 1 à 3 isoformes de chaque groupe, donnant un nombre de combinaisons possibles de quelques centaines de milliers. *A priori*, deux neurones qui expriment les mêmes combinaisons ne peuvent pas interagir entre eux, la « reconnaissance de soi » via une interaction homophile entre protocadhérines entraînant plutôt une répulsion qu'une adhérence, ce qui évite à un neurone de faire synapse avec lui-même³⁷¹.

Si les protocadhérines regroupées permettent d'éviter une synaptogenèse avec soi-même, les cadhérines classiques pourraient participer à la spécificité synaptique. Elles sont localisées aux synapses, dans les parties pré- et post-synaptiques, et leur longueur (environ 40 nm) est compatible avec l'épaisseur de la fente synaptique. Surtout, elles opèrent des jonctions d'adhérence, contrairement aux protocadhérines regroupées qui sont *a priori* répulsives. Certains éléments indiquent leur intervention dans la synaptogenèse : l'inhibition de l'action des cadhérines peut entraîner des synapses plus petites, des épines dendritiques anormales, et une modification de la fonction synaptique. De plus, les cadhérines classiques peuvent recruter des protéines impliquées dans la synaptogenèse, comme *cdh2* qui peut recruter la neuroligine-1 et les caténines qui participent à la synaptogenèse. Enfin, *cdh2* participe au regroupement des vésicules synaptiques. Il semble que les cadhérines puissent être spécifiques de types cellulaires : *cdh1* est localisée aux stades matures aux synapses inhibitrices et *cdh2* aux synapses excitatrices. Si les cadhérines classiques participent bien à la spécificité synaptique, leur expression combinatoire (une cellule exprime en général une cadhérine de type I et plusieurs cadhérines de type II) ne permettrait que 100 à 1000 combinaisons possibles. **Ainsi, si les cadhérines classiques participent à la synaptogenèse, seules, elles ne peuvent permettre qu'une spécificité rudimentaire**^{368,372}.

Pour l'instant, seule *cdh2* a été bien étudiée dans le développement embryonnaire des interneurones (**Figure 16**). *Cdh2* est exprimée très largement dans le télencéphale, y compris dans les neuroblastes GABAergiques. Dans un premier temps, une possible

interaction homophilique en *trans* a été testée *in vitro*. Des explants de MGE ont été cultivés sur un substrat synthétique présentant la partie extracellulaire de *cdh2*. Les neuroblastes GABAergiques migrent sur ce substrat en élaborant un processus conducteur. Cependant, les cellules migrent plus tôt sur ce substrat que sur un substrat formé de cellules corticales (4-6 heures après le dépôt de l'explant au lieu de 18 heures) ou formé d'autres protéines d'adhérence (*cdh1*, *cdh6*, *cdh11*, laminine) et plus rapidement (60 µm/heure au lieu de 50 µm/heure). De plus, les neuroblastes ne présentent pas de zone de gonflement dans le processus conducteur et de mouvement saltatoire du noyau. Ils ont le plus souvent une inversion de la polarité de positionnement de l'appareil de Golgi (normalement à l'avant du noyau dans la zone de gonflement), une distance plus grande entre le noyau et le centrosome, et ils ne présentent pas de cil primaire. Ces phénotypes sont parfois accompagnés d'un phénotype multipolaire³⁷³. Sur un substrat *cdh2*/laminine, la plupart de ces défauts disparaissent, excepté le mouvement saltatoire du noyau. En inhibant *in vitro* la fonction de *cdh2* dans les neuroblastes (incorporation d'une forme dominante négative), la vitesse de migration des neuroblastes est réduite, on trouve davantage d'interneurones avec une inversion de polarité (avec une mauvaise position de l'appareil de Golgi mais aussi de *myh10* normalement situé à l'arrière du noyau) et le processus conducteur est plus court. En inactivant *Cdh2* dans les progéniteurs de la MGE (embryons *Nkx2.1-cre:Cdh2^{lox/lox}*), en plus de défauts d'intégrité du neuroépithélium de la MGE, les neuroblastes GABAergiques restent dans le subpallium et n'entrent pas dans le néocortex à E14,5 ; certains sont dans le néocortex à E16,5, mais peu d'entre eux atteignent la plaque corticale (**Figure 16**). Des défauts de migration sont visibles lors de la culture d'explants issus de la MGE de ces embryons (moins de cellules migrent, leur direction de migration est altérée, le processus conducteur est raccourci et l'appareil de Golgi est à l'arrière du noyau). En inactivant *Cdh2* dans les neuroblastes de la MGE (embryons *Lhx6-cre:Cdh2^{lox/lox}*), moins de neuroblastes GABAergiques entrent dans le néocortex. **Ces résultats montrent un rôle de *cdh2* dans l'intégrité du neuroépithélium de la MGE, dans la polarité intrinsèque et la motilité des neuroblastes, et dans leur capacité à migrer dans la bonne direction. De plus, ils**

montrent que si des interactions homophiliques de cdh2 en *trans* promeuvent la motilité des neuroblastes GABAergiques, elles ne sont pas suffisantes pour un phénotype migratoire normal³⁷⁴.

Une autre cadhérine participerait au développement des interneurones : cdh13 (T-cadhérine). Elle diffère des cadhérines classiques par son ancrage à la membrane grâce à au glycosylphosphatidylinositol (GPI), son absence de tryptophane dans le premier domaine EC et son absence de partie cytoplasmique³⁶⁵. De E13,5 à E15,5, cdh13 n'est pas exprimée dans les neuroblastes GABAergiques mais dans la plaque corticale (soit entre les flux superficiel et profond) et dans les axones thalamo-corticaux. Plus tard, à E18,5, cdh13 est surtout exprimée dans le flux profond et la plaque corticale, y compris dans quelques neuroblastes GABAergiques. En l'absence de cdh13, il y a davantage de prolifération dans la MGE *in vivo* mais également davantage de neuroblastes GABAergiques qui entrent en apoptose *in vitro*. Le nombre de neuroblastes GABAergiques dans le néocortex n'est pas altéré à E15,5 mais leur nombre est diminué à E18,5, en particulier dans les régions médiales corticales. Le nombre de neuroblastes GABAergiques est réduit dans la plaque corticale et est plus élevé dans la zone marginale. Cette étude indique ainsi un rôle complexe de cdh13 dans le développement du télencéphale (cdh13 est exprimée dans plusieurs types cellulaires) mais ne montre pas de preuve génétique par délétion conditionnelle d'un rôle direct de cdh13 dans le développement des neuroblastes GABAergiques²⁰¹. Par ailleurs, cdh13 participe à la synaptogenèse des interneurones dans l'hippocampe^{362,375}.

En conclusion, seule cdh2 a pour l'instant été décrite dans les progéniteurs de la MGE et dans la migration tangentielle des neuroblastes GABAergiques, en intervenant dans leur polarité cellulaire et leur motilité. Il est probable que cdh2 participe à la synaptogenèse des interneurones, étant localisée dans la plupart des synapses. En revanche, l'étude des autres cadhérines détectées dans les études transcriptomiques dans la MGE reste à être effectuée et la l'hypothèse d'un code d'adhérence lors de la synaptogenèse restent à être testée.

B. Rôles des aGPCRs dans le développement du système nerveux central, et en particulier celui des interneurones

Une nouvelle famille de récepteurs couplés aux protéines G a été définie récemment, celle des aGPCRs, avec une nomenclature définie en 2015. Le génome murin en comprend 31, celui de l'humain 33 (suite à deux duplications), répartis en 9 types, ce qui en fait la deuxième famille de GPCRs en nombre de gènes. Tous les métazoaires comportent des aGPCRs. En tant que GPCRs, les aGPCRs ont **sept domaines transmembranaires**. A l'exception de l'un d'entre eux, ils ont tous **un domaine autoprotéolytique GAIN** (pour *G-protein-coupled receptor autoproteolysis-inducing domain*). Ils ont la caractéristique d'avoir de longues parties extracellulaire et intracellulaires. Le domaine GAIN peut auto-cliver le récepteur, conduisant à la libération d'une protéine libre extracellulaire. Ce clivage peut avoir lieu dans le réticulum endoplasmique. Pour certains aGPCRs, il a été montré que la partie extracellulaire a des fonctions d'adhérence, et ces fonctions sont prédites pour tous les aGPCRs. Certains aGPCRs sont orphelins aujourd'hui (aucun ligand chimique ne leur est connu) et il est possible que certains ne détectent pas de ligand chimique mais seulement des forces mécaniques par leurs propriétés d'adhérence. Par exemple, certains d'entre eux interagissent avec la protéine du complément CD55, le chondroïtine sulfate B, le collagène IV, la neurexine-1 α , ou avec des membres de la famille des protéines transmembranaires

riches en leucine fibronectine. Bien qu'étant des GPCRs, il n'a pas été trouvé de motifs dans la séquence des aGPCRs qui puissent interagir avec des protéines G ; cependant, certains ont été montrés comme pouvant interagir avec des protéines G. Certains aGPCRs permettent une transduction indépendante des protéines G^{376,377}.

Au cours du développement du système nerveux central, les aGPCRs participent à la migration neuronale, l'adhérence à la matrice extracellulaire, la transduction d'une force mécanique, la dendritogenèse, la synaptogenèse, la fonction synaptique, le guidage axonal et la myélinisation³⁷⁸.

Plus particulièrement, les aGPCRs de type IV, *adgrc1* à *adgrc3* (CELSR1 à CELSR3) ont été décrits dans plusieurs régions cérébrales. Ces protéines ancestrales, une étant présente chez tous les métazoaires (seuls les vertébrés en ont trois) ont 9 domaines EC dans leur partie N-terminal, présentent des domaines **laminine-EGF** (*epithelial growth factor*), **des domaines EGF** liant le calcium et **laminine-G/pentraxine**. Ces différents domaines ont rendu difficile leur classification parfois nommées cadhérines flamingo, parfois protocadhérines^{363,376}. Leur domaine GAIN est prédit comme ne pouvant pas s'autocliner, ils peuvent former des homodimères en *trans* ; la possibilité d'une interaction avec des cadhérines n'a pas été testées³⁷⁶.

Au cours du développement du système nerveux central, *adgrc1* est principalement exprimé dans les zones prolifératives, *adgrc3* dans les cellules postmitotiques, *adgrc2* dans les deux types cellulaires³⁷⁹. Après la naissance, chez la souris, *adgrc1* cesse d'être exprimé ; *adgrc3* reste exprimé dans le cortex, le cervelet, l'hippocampe, la voie de migration rostrale (se pose la question de la voie de migration médiale chez l'humain) et le bulbe olfactif ; l'expression d'*adgrc2* reste stable^{380,381}. *Adgrc1* participe à la formation du tube neural en étant localisé aux jonctions d'adhérence du neuroépithélium et en permettant la contraction du cytosquelette d'actine à l'apex des cellules de la future zone ventriculaire³⁸² ; *adgrc2* et *adgrc3* participent à la migration neuronale, par exemple celle des neurones du noyau branchio-moteur du nerf facial, la dendritogenèse et la guidage axonal³⁷⁸. Plus

généralement, *adgrc1* est impliqué dans la polarité planaire, par exemple la polarisation des cils motiles et des **stéréocils** (microvillosités non motiles composées d'actine) dans les cellules multiciliées, par exemple dans les **cellules sensorielles auditives** (ou **cellules ciliées**, en anglais *hair cells*) dans la cochlée. *Adgrc2* et *adgrc3* sont impliqués dans la ciliogenèse, par exemple dans celles **des cellules épendymaires**, les cellules multiciliées dans la partie ventrale des ventricules cérébraux qui participent au déplacement du liquide céphalo-rachidien³⁸¹⁻³⁸³.

Adgrc3 serait directement impliqué dans le développement des interneurons. Dans des souris où un allèle codant pour *adgrc3* a été remplacé par une séquence codant pour l'EGFP, la majorité des cellules qui exprimait l'EGFP exprimait également le GABA. Peu de cellules EGFP n'exprimaient pas le GABA chez l'adulte, indiquant qu'*Adgrc3* est principalement associé à des interneurons, dont les interneurons issus de la MGE (à parvalbumine et à somatostatine) et de la CGE (à calbindine-2). Au cours du développement embryonnaire, *Adgrc3* est exprimé dans les progéniteurs et le manteau des trois éminences ganglionnaires (à E13,5 et E14,5), et dans les flux de migration tangentielle (superficiel et profond). Seuls les neuroblastes à calbindine-2 ont pu être suivis (la calbindine-2 étant exprimée pendant la vie embryonnaire contrairement à la parvalbumine et la somatostatine). En l'absence d'*adgrc3*, le nombre de neuroblastes à calbindine-2 est réduit dans le flux profond mais pas dans le flux superficiel, dans tout le néocortex. Ce défaut peut être la conséquence d'un défaut de prolifération ou de migration. Les auteurs n'ont pas observé de cellules en apoptose dans les éminences ganglionnaires, suggérant un défaut de migration. En regardant plus précisément la distribution des neuroblastes à calbindine-2, il est apparu qu'ils s'accumulaient à la frontière entre le pallium et le subpallium à E17,5-E18,5, mais pas à E13,5-E15,5 (les neuroblastes issus de la CGE migrent à des stades plus tardifs que ceux issus de la MGE). Les cellules qui se sont accumulées présentent un corps cellulaire allongé, un long processus conducteur sans direction privilégiée, et un court processus arrière (**Figure 16**). En ce qui concerne certains neuroblastes GABAergiques exprimant la

calbindine-1, qu'ils soient nés à E13,5 ou E15,5, certains sont observés dans le néocortex en l'absence d'agcr3, mais avec une distribution différente. Leur nombre est inchangé dans la zone marginale mais plus faible dans la plaque corticale et plus important dans le sous-plateau (dans les régions corticales rostrales et caudales), indiquant un défaut de migration radiaire. Nous avons vu que l'entrée dans le néocortex s'accompagne d'une répulsion de sema3a dans le subpallium, détectée par les neuroblastes GABAergiques grâce à nrp1, et d'une attraction dans le néocortex par nrg1 détecté par les neuroblastes GABAergiques grâce à erbb4. En l'absence d'adgrc3, il apparaît une accumulation de l'immuno-marquage d'erbb4 à la frontière entre le pallium et le subpallium, ce qui est cohérent avec une accumulation du marquage calbindine-2, sans modification de la distribution du marquage nrp1. De plus, des cultures *in vitro* d'explants issus de MGE ou de CGE ne révèlent pas de différence de surface de migration. Ainsi, les neuroblastes GABAergiques ne présentent pas de défauts de motilité ou de migration intrinsèques. Il est possible qu'ils ne puissent pas détecter des signaux de l'environnement qui permettent d'entrer dans le néocortex. Cela ne serait pas dû à une absence d'expression d'erbb4 ou nrp1. **Etant donné que les adgrc sont impliqués dans la polarité planaire et la formation de cils primaires, on pourrait imaginer une implication d'adgrc3 dans le développement du cil primaire (détectant les signaux de l'environnement) ou du bon positionnement d'erbb4 ou nrp1 au sein des neuroblastes GABAergiques. Notons qu'adgrc3 semble surtout critique à la migration tangentielle des neuroblastes GABAergiques issus de la CGE et à la migration radiaire des neuroblastes GABAergiques en général.**

C. **Cdhr23 et cdhr15 : deux protéines apparentées aux cadhérines opérant la transduction mécano-électrique dans les cellules ciliées**

Les études de transcriptomique ont détecté dans la MGE l'expression de deux gènes codants pour les protéines apparentées aux cadhérines, *cdhr23* (aussi connue comme *cdh23*, pour cadhérine-23) et *cdhr15* (aussi connue comme *pcdh15*, pour protocadhérine-15). Les quantités d'ARNm détectées étaient faibles, environ 20 fois plus faible que celles pour *adgrc3*¹⁰⁶. Les protéines apparentées aux cadhérines constituent une sous-famille de cadhérines récemment définie. Cette sous-famille rassemble des protéines qui avaient été classées comme cadhérines ou protocadhérines mais qui se distinguaient trop de ces familles. Elles se définissent par au moins **deux domaines EC consécutifs et ont la caractéristique de ne pas avoir de résidu tryptophane dans leur partie N-terminal**. *Cdhr23* et *cdhr15* possèdent respectivement 27 et 11 domaines EC et une partie cytoplasmique non conventionnelle (elle n'interagit pas avec *ctnnd1* et *ctn nb1* mais comporte **un motif de liaison au domaine PDZ**). L'isoforme longue de *cdhr23* comporte 3354 acides aminés et celle de *cdhr15*, 1943 acides aminés. Elles sont connues comme pouvant interagir en *trans* différemment des cadhérines classiques, selon une interaction en « serrage de main ». Ces cadhérines géantes peuvent former un lien de 90 à 250 nm lorsqu'elles interagissent entre elles^{384,385}. Ce sont des cadhérines ancestrales. Des orthologues pour *Cdhr23* ont été trouvés chez l'anémone étoilée (*Nematostella vectensis*) donc *Cdhr23* serait présent *a priori* chez tous les eumétazoaires. En ce qui concerne *Cdhr15*, un orthologue existe chez les protostomiens mais pas chez l'anémone étoilée. *Cdhr15* serait donc présente chez tous les bilatériens^{365,366} (**Figure 16**).

Ces deux protéines apparentées aux cadhérines sont connues comme pouvant former des liens fibreux dans les cellules ciliées, par exemple dans les cellules ciliées auditives et de la ligne latérale chez le poisson zèbre (*Danio rerio*), l'orthologue pour *cdhr23* dans les villosités de l'anémone étoilée^{365,366}. Chez l'humain, *CDHR23* (*USH1D*) et *CDHR15* (*USH1F*)

sont associés au **syndrome d'Usher de type I (USH1)**. USH1, transmis de manière récessive, est caractérisé par une surdité profonde et des troubles vestibulaires à la naissance ainsi que des troubles visuels qui se manifestent par une rétinopathie pigmentaire avant la puberté. Ces trois défauts sont dus à l'absence des liens fibreux formés par cdhr23 et cdhr15 dans les cellules sensorielles auditives, vestibulaires, et dans des processus comparables à des microvillosités dans les photorécepteurs, processus appelés **processus calycéaux**. Les cellules sensorielles auditives comportent à leur apex **une touffe ciliaire** composée de 3 rangées de microvillosités, appelées stéréocils, organisés en une structure en forme de V et dont la taille est décroissante vers l'intérieur. Les stéréocils sont connectés à leur apex par des **liens apicaux** (en anglais, *tip links*), formés d'homodimères en *cis* de cdhr23 dans la partie apicale du lien et d'homodimères en *cis* de cdhr15 dans la partie basale du lien : un lien apical relie chaque stéréocil de la petite rangée de la touffe ciliaire au stéréocil adjacent de la rangée moyenne, et chaque stéréocil de la rangée moyenne à un stéréocil adjacent de la grande rangée. La touffe ciliaire opère la **transduction mécano-électrique**. Les ondes mécaniques intracochléaires générées par une stimulation sonore entraînent une déflexion des stéréocils, augmentant ainsi la tension exercée sur les liens apicaux. Ces derniers (en réalité cdhr15, qui est à la base des liens apicaux) sont associés à un complexe moléculaire comprenant des canaux ioniques (notamment les sous-unités tmc1 et tmc2 qui sont associées à des protéines transmembranaires LHFPL5 et tmie). Cette tension entraîne l'ouverture des canaux de transduction mécano-électrique et la dépolarisation des cellules sensorielles par entrée d'ions potassiques et calciques^{3,384-389} **(Figure 16)**.

Les modèles murins d'USH1 reproduisent les mêmes phénotypes que les patients, excepté la rétinopathie pigmentaire, les processus calycéaux n'étant pas présents chez la souris. Ils ont permis de comprendre le fonctionnement de la transduction mécano-électrique, la composition des liens apicaux et des interactants de cdhr23 et cdhr15. Cdhr23 et cdhr15 interagissent de manière indirecte avec le cytosquelette d'actine. De plus, cdhr23 et cdhr15 font partie de liens transitoires latéraux entre les stéréocils et entre les stéréocils et une

structure transitoire apparentée au cil primaire appelée **kinocilium**^{384,388,390}. Par ailleurs, il a été montré *in vitro* que *cdhr23* interagit avec une protéine régulatrice du cytosquelette de tubuline, **camsap3**³⁹¹. De plus, des variants de *cdhr15* pourraient être adressés à la synapse des cellules ciliées³⁹².

Plusieurs indices suggèrent une implication de *CDHR23* et *CDHR15* dans le développement du système nerveux central, en plus de leur rôle dans le système nerveux périphérique : leur expression déjà décrite mais peu documentée (dans les zones ventriculaires cérébrales chez l'embryon murin), l'association d'USH1 (sans connaître les gènes affectés ; les autres gènes associés à USH1 sont les gènes codant la **myosine-VIIa** ou USH1B, l'**harmonine** ou USH1C, **USH1E**, **sans** ou USH1G, **cib2** ou USH1J) parfois avec certains troubles neurologiques comme la schizophrénie et l'autisme^{356,393}, l'association de *CDHR23* avec la maladie d'Alzheimer³⁹⁴⁻³⁹⁶ et l'extraversion³⁵⁵, l'association de *CDHR15* avec l'autisme, la schizophrénie ou des troubles bipolaires³⁹⁷⁻³⁹⁹.

Les personnes portant des mutations pour ces gènes, profondément sourdes, portent généralement un implant cochléaire, sensé rétablir la perception auditive. Cependant, certains de ces patients présentent des difficultés de compréhension du langage, alors que d'autres patients sourds et implantés ne présentent pas de telles difficultés, renforçant l'hypothèse d'un rôle de *cdhr23* et *cdhr15* dans le développement du système nerveux central, et en particulier auditif⁴⁰⁰. Toutefois, ces données sont éparses et aujourd'hui USH1 n'est pas associé formellement à des troubles neurologiques ou des défauts intrinsèques du système auditif central.

D. Adgrv1 : un aGPCR impliqué dans le développement de la touffe ciliaire des cellules ciliées

Les études transcriptomique ont détecté l'expression dans les progéniteurs de la MGE du gène codant pour adgrv1, un aGPCR¹³⁷. Son expression est aussi détectée dans la glie radiaire de la zone sous-ventriculaire externe corticale chez l'humain⁴⁰¹. Adgrv1 est un aGPCR atypique, il constitue un sous-type d'aGPCR à lui seul (type IX). Son changement régulier de nomenclature témoigne des difficultés à le classer. D'abord associé à une pathologie chez la souris (mass1 pour *monogenic seizure-susceptible*), il a été nommé VLGR1 (pour *very large G-protein-coupled receptor-1*) en raison de son long domaine extracellulaire qui en fait la protéine transmembranaire la plus longue (6307 acides aminés pour l'isoforme longue), puis GPR98 pour le rapprocher des GPCRs et enfin adgrv1 lorsque la famille des aGPCRs a été établie. Dans sa partie extracellulaire, adgrv1 contient 35 **domaines calx-β**, un domaine liant le calcium trouvé dans les échangeurs des ions sodium et calcium (ces domaines sont aussi présents dans des protéines interagissant avec la matrice extracellulaire ou dans le cadre d'interactions cellule-cellule de façon similaire à l'intégrine-β4, ou MAFp3 chez les éponges), un domaine **laminine-G/amino-terminal thrombospondin-like/pentraxine** qui interagit avec des récepteurs ou des protéines extracellulaires, sept **domaines epitempine** (également appelés EAR pour *epilepsy associated repeat*). Dans sa partie intracellulaire, adgrv1 contient **un motif de liaison au domaine PDZ** et peut interagir avec les protéines G_{as} et G_{αq}^{6,402}. Adgrv1 est l'un des aGPCRs les plus ancestraux : il est présent chez l'anémone étoilée et chez le coléoptère *Meloe brevicollis*^{403,404} (**Figure 16**).

Adgrv1 est exprimé dans la plupart des tissus chez l'adulte et sa plus forte expression est dans le système nerveux central pendant l'embryogenèse à partir de E6,5, en particulier dans les zones ventriculaires. Dans le système nerveux central adulte, *adgrv1* est exprimé dans la gaine de myéline du **colliculus inférieur** (noyau auditif du mésencéphale) et dans les noyaux mamillaires de l'hypothalamus⁴⁰². Chez l'humain, *ADGRV1* (*USH2C*) est associé **au syndrome d'Usher de type II (USH2)**, caractérisé par une surdité modérée à sévère à la naissance, une absence de trouble vestibulaire et une rétinite pigmentaire se développant au cours de la puberté. *Adgrv1* est un composant de liens fibreux temporaires à la base des stéréocils (**liens baso-latéraux**, en anglais *ankle links*), qui participent à la morphogenèse de la touffe ciliaire. En l'absence d'*adgrv1*, les liens baso-latéraux disparaissent et la touffe ciliaire présente une morphologie anormale mais est toujours capable d'opérer la transduction mécano-électrique, de façon anormale cependant^{4,5,390,405-407} (**Figure 16**).

Les modèles murins d'*USH2* reproduisent les mêmes phénotypes que les patients, excepté la rétinite pigmentaire. Ils ont permis de comprendre le développement de la touffe ciliaire et de trouver des interactants d'*adgrv1*. Par ailleurs, des variants d'*adgrv1* pourraient être adressés à la synapse et interagir avec la protéine synaptique **SNAP25**³⁹².

Adgrv1 a d'abord été identifié chez la souris comme étant un gène de prédisposition aux **crises réflexes audiogènes** chez les souris *Frings*, entre P21 et P42^{402,406,408-411}. Les crises audiogènes sont induites chez la souris par une stimulation sonore de forte intensité et généralement de basse fréquence ; elles se manifestent par un mouvement gyrotaire rapide (dit « course folle », en anglais, *wild running*), suivi d'une phase clonique puis d'une phase tonique. L'animal meurt souvent après la crise par arrêt cardiaque ou respiratoire. Cependant, si le son est arrêté au début de la crise, les phases clonique, tonique et de mort de l'animal peuvent être évitées⁴¹². Chez l'humain, *ADGRV1* a été associé à l'épilepsie³⁵⁸, à l'aptitude musicale (créativité musicale, capacité à faire et comprendre la musique, la danse)⁴¹³ et *USH2* a été associé à la schizophrénie et des troubles bipolaires (sans précision des gènes affectés ; les autres gènes associés à *USH2* sont les gènes codant pour

l'**usherine** ou USH2A et la **whirlin** ou USH2D)^{393,414}. **ADGRV1** a donc probablement un rôle dans le développement du système nerveux central, et en particulier auditif, en plus de son rôle dans le système nerveux périphérique. Toutefois, ces données sont éparses et aujourd'hui USH2 n'est pas associé formellement à des troubles neurologiques ou des défauts intrinsèques du système auditif central.

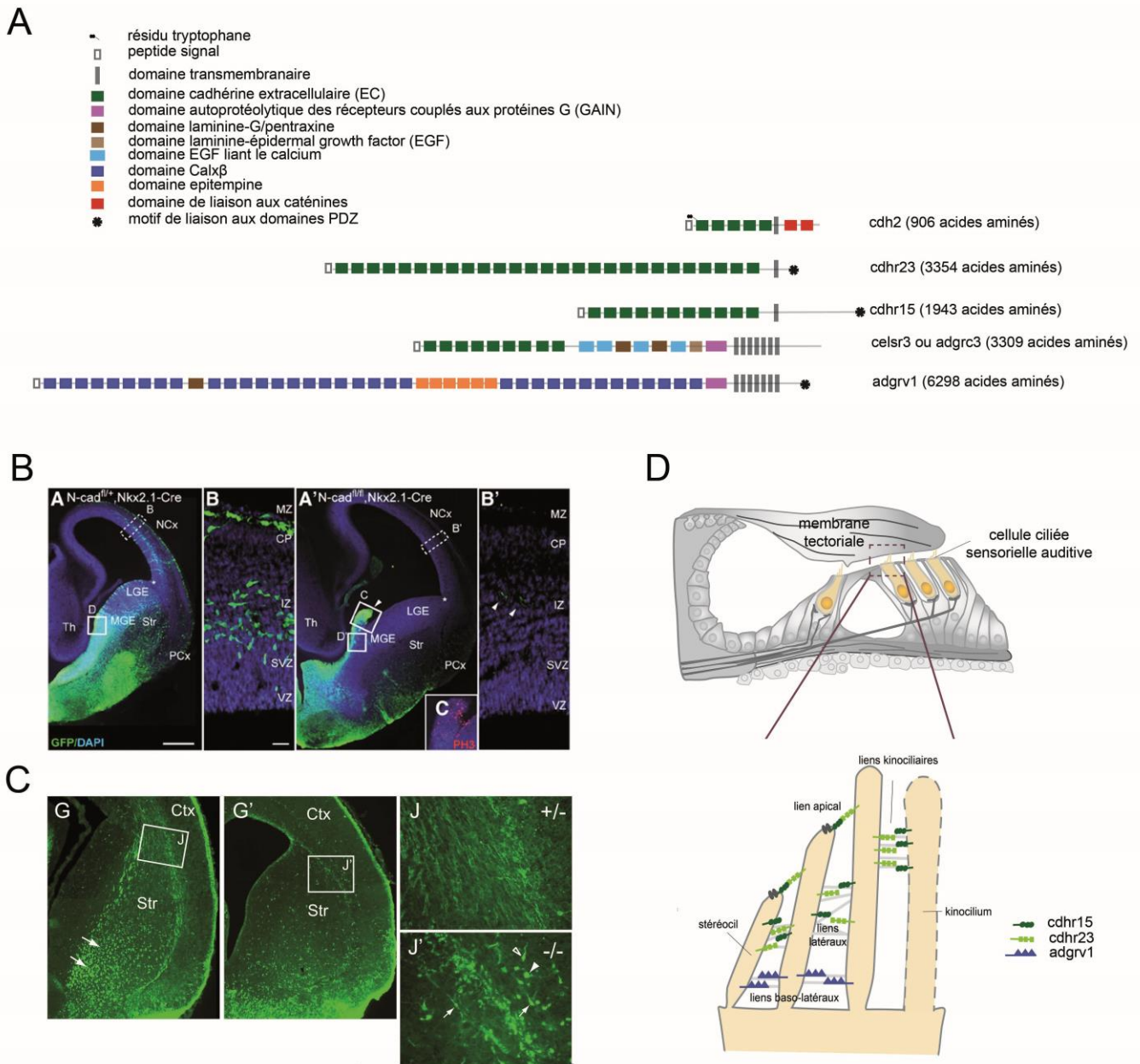


Figure 16 Protéines d'adhérence impliquées dans le développement des interneurons. **A**, Schémas des structures des protéines d'adhérence directement impliquées dans le développement des précurseurs d'interneurons. **B**, Image issue de Luccardini *et al.*, 2013³⁷⁴ montrant le défaut de migration des neuroblastes GABAergiques issus de la MGE (en vert) chez des embryons murins à E14,5 où *Cdh2* a été invalidé dans les progéniteurs de la MGE, qui expriment *Nkx2.1* (contrôle : A-B, mutant homozygote conditionnel : A'-B' ; les noyaux cellulaires sont en bleus). Les images zoomées montrent l'absence de neuroblastes migrant dans le néocortex. **C**, Image issue de Ying *et al.*, 2009³⁸⁰ montrant un immuno-marquage pour la calbindine-2 chez des embryons contrôles (G, J) et mutants homozygotes pour *Celsr3* (G', J') à E17,5. Les images zoomées montrent une accumulation chez le mutant des précurseurs de neuroblastes à calbindine-2 à la frontière entre le pallium et le subpallium. **D**, Schéma représentant l'**organe de Corti** (situé dans la cochlée, l'oreille interne), avec notamment les cellules ciliées sensorielles auditives (en haut). En bas, la touffe de microvillosités (stéréocils) à l'apex de ces cellules entre P2 et P9, avec différents liens fibreux entre les stéréocils ou entre les stéréocils et le kinocilium (analogue au cil primaire) : les liens apicaux (opérant la transduction mécano-électrique), les liens latéraux, les liens baso-latéraux et les liens kinociliaires. *Cdhr23* et *cdhr15* forment notamment le lien apical et *adgrv1* est un composant des liens baso-latéraux (cf. Michalski & Petit, 2015³⁹⁰). Nous verrons dans les résultats que ces trois protéines participent au développement de précurseurs d'interneurons. Abréviation : striatum (**Str**), thalamus (**Th**).

L'objectif de mon projet de thèse était d'étudier le rôle de *cdhr23*, *cdhr15* et *adgrv1* dans le développement du système nerveux central. Nous avons vu que leur expression dans la MGE ainsi que leur association possible avec des troubles neurologiques soutenait cette hypothèse. Des mutations à l'état homozygote pour *CDHR23* ou *CDHR15* d'une part, et *ADGRV1* d'autre part, conduisent, respectivement, à une surdité profonde et modérée à sévère. Ainsi, le possible rôle de ces gènes dans le développement du système nerveux central auditif aurait été masqué par les défauts cochléaires. L'étude de leur expression et leur association aux crises audiogènes chez la souris, déjà connue pour *Adgrv1*, m'a conduit vers l'étude de leur rôle dans le développement des interneurons du cortex auditif.

Résultats

Adapté de Libé-Philippot et al., article accepté⁴¹². Lorsque des résultats ne sont pas dans l'article, j'indique que les données ne sont pas publiées.

I. Des neuroblastes GABAergiques, du manteau de la MGE au cortex auditif présomptif, synthétisent *cdhr23* et *cdhr15* durant leurs migrations tangentielle et radiaire, chez la souris

Afin d'étudier le rôle possible de *cdhr23* et *cdhr15* dans le système nerveux central, et en particulier du télencéphale, j'ai réalisé des immuno-marquages contre les parties extracellulaires de ces deux protéines.

Ces deux protéines ne sont pas détectées avant E13,5. A ce stade, *cdhr23* et *cdhr15* commencent à être détectées dans le subpallium, en particulier dans le manteau de la MGE, le globus pallidus et le striatum (**Figure 17A-C**). Les marquages pour *cdhr23* et *cdhr15* colocalisent, en particulier dans la MGE (**Figure 17E**). Etant détectées dans le manteau et non dans la zone sous-ventriculaire de la MGE, j'ai réalisé un co-marquage pour ces protéines et **MKI67**, un marqueur de cellules prolifératives. *Cdhr23* et *cdhr15* ne sont pas localisées dans la zone exprimant **MKI67**, ce qui signifie que les deux protéines apparentées aux cadhérines ne sont donc pas synthétisées par les progéniteurs mais par des cellules post-mitotiques, c'est-à-dire les neuroblastes GABAergiques (**Figure 17D**). Afin de déterminer si ces immuno-marquages étaient bien associés aux neuroblastes GABAergiques, j'ai réalisé ces immuno-marquages chez des embryons synthétisant la protéine fluorescente rouge tdTomato dans les interneurons issus de la MGE dès le stade progéniteurs (embryons *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato*). A E13,5, les deux marquages colocalisent avec tdTomato, confirmant une expression de *cdhr23* et *cdhr15* (et même une co-expression puisque les deux marquages colocalisent) dans les neuroblastes GABAergiques (**Figures 17A-C**).

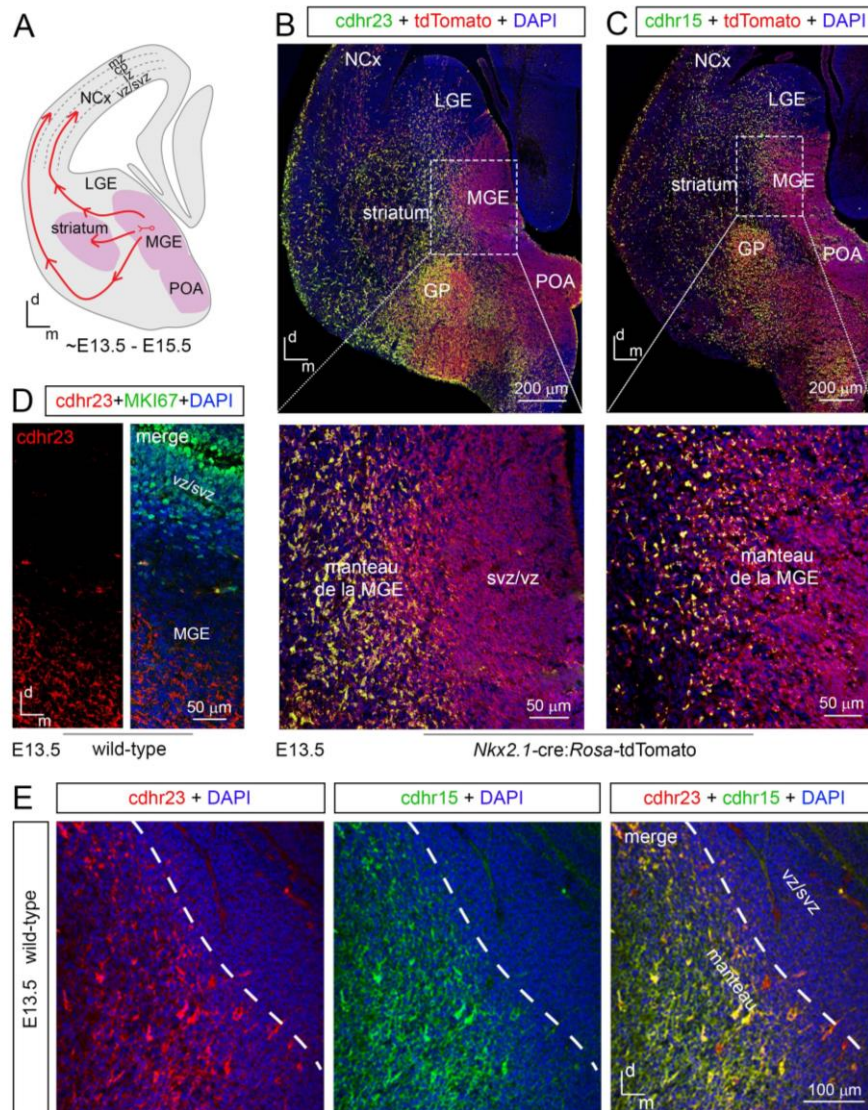


Figure 17 Co-expression de cdhr23 et cdhr15 dans le subpallium à E13,5 chez la souris. **A**, Schéma représentant les flux de migration tangentielle au sein d'une tranche coronale télencéphalique. **B-C**, Tranches de télencéphale basal d'embryons *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato* à E13,5 immuno-marquées pour tdTomato, cdhr23 (**B**) et cdhr15 (**C**), avec des vues zoomées en dessous. **D**, Tranche coronale de MGE à E13,5 d'un embryon sauvage (*wild-type*) immuno-marqué pour cdhr23 et MKI67, un marqueur de cellules en division. **E**, Vue zoomée d'une coupe coronale de MGE d'un embryon sauvage à E13,5 immuno-marqué pour cdhr23 et cdhr15. Noyaux cellulaires marqués en bleu (**DAPI**). Abréviations : néocortex (**NCx**) ; globus pallidus (**GP**) ; latéral (l) ; médial (m) ; dorsal (d). Adapté de Libé-Philippot *et al.*, article accepté⁴¹².

A E14,5-15,5, stades où la migration tangentielle se manifeste par les deux flux superficiel et profond, les deux protéines apparentées aux cadhérines sont détectées dans les deux flux, en plus du striatum. Leurs marquages colocalisent toujours et sont associés aux neuroblastes GABAergiques chez les embryons *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato* (**Figures 18 et 19**).

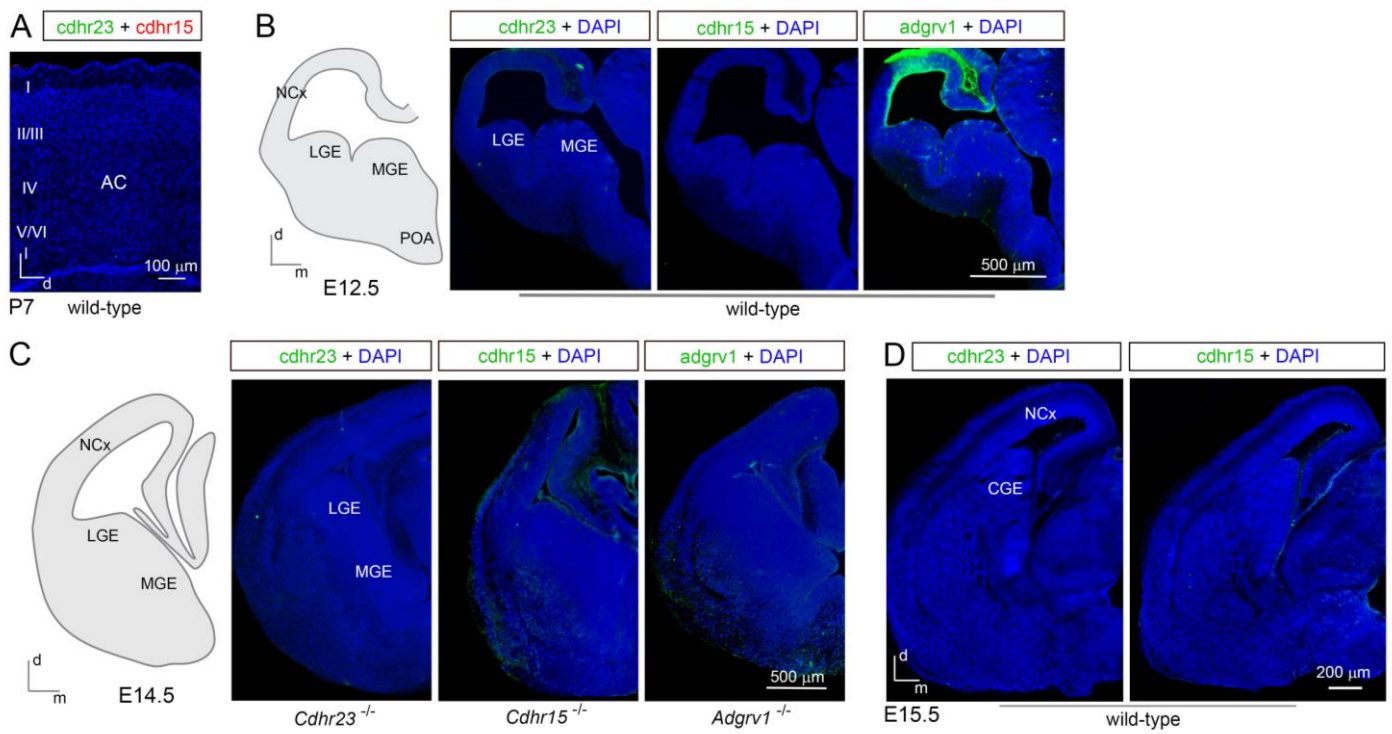


Figure 18 Immunomarkages témoins. **A**, Tranche coronale de cortex auditif à P7 d'animal sauvage (*wild-type*) immunomarkée pour *cdhr23* et *cdhr15*. **B**, Schéma d'une tranche coronale de télencéphale à E12,5 et images correspondantes chez des embryons sauvages immunomarkés pour *cdhr23*, *cdhr15* et *adgrv1*. **C**, Schéma d'une tranche coronale de télencéphale à E14,5 et images correspondantes chez des embryons *Cdhr23*^{-/-}, *Cdhr15*^{-/-}, *Adgrv1*^{-/-} immunomarkés pour *cdhr23*, *cdhr15* et *adgrv1*, respectivement. **D**, Tranches coronales de télencéphale à E15,5 d'embryons sauvages immunomarkées pour *cdhr23* ou *cdhr15*. Noyaux cellulaires marqués en bleu (DAPI). Abréviations : néocortex (**NCx**); latéral (**l**); médial (**m**); dorsal (**d**). Adapté de Libé-Philippot *et al.*, article accepté⁴¹².

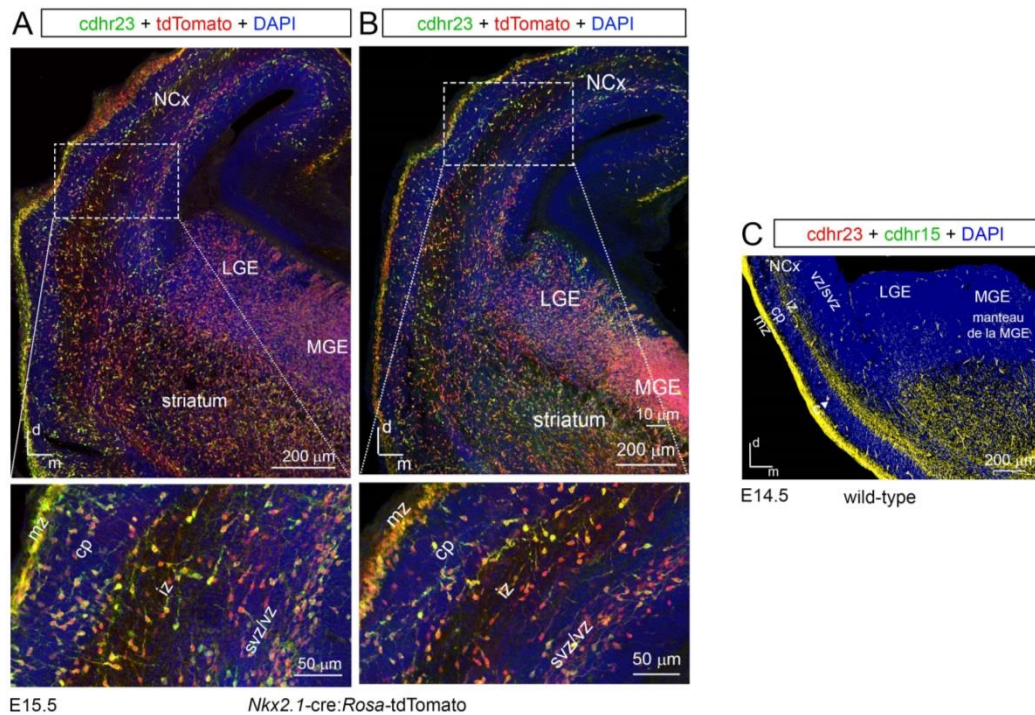


Figure 19 Cdhr23 et cdhr15 sont co-exprimées dans des neuroblastes GABAergiques pendant leur migration tangentielle chez la souris. **A-B**, Tranches coronales de télencéphale d'embryon *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato* à E15,5 immunomarkées pour *cdhr23* (**A**) et *cdhr15* (**B**), avec des vues zoomées en dessous. **C**, Tranche coronale de télencéphale d'embryon sauvage (*wild-type*) immunomarkée pour *cdhr23* et *cdhr15*. Noyaux cellulaires marqués en bleu (DAPI). Abréviations : néocortex (**NCx**); dorsal (**d**); médial (**m**). Adapté de Libé-Philippot *et al.*, article accepté⁴¹².

Notons que les cadhérines sont détectées à E13,5 dans le manteau de la MGE, et plus particulièrement sa région ventrale, mais que ce n'est pas le cas avant E13,5, ni à E14,5-E15,5, d'une part, et d'autre part, que les marquages ne sont observés que dans des tranches médiales selon l'axe antéro-postérieur. Je n'ai pas détecté *cdhr23* et *cdhr15* dans les régions antérieures du télencéphale, ni dans les régions très postérieures (où il n'y a que la CGE, **Figure 18D**). Elles sont donc détectées dans un même plan transversal, dans le striatum et les deux flux de migration tangentielle.

A E18,5, *cdhr23* et *cdhr15* ne sont détectées que dans une aire restreinte du néocortex, dans le futur cortex auditif. Leurs marquages colocalisent toujours avec les neuroblastes GABAergiques chez les embryons *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato*. A ce stade, 96% des cellules qui expriment une protéine apparentée aux cadhérines expriment l'autre et 30% des neuroblastes GABAergiques du futur cortex auditif (la zone marginale étant exclue) expriment ces protéines apparentées aux cadhérines ($n = 5$ embryons, **Figure 20A-C**).

Cdhr23 et *cdhr15* sont encore détectées dans le futur cortex auditif après la naissance, jusqu'à P7 (**Figure 18A**). Elles sont associées aux interneurons immatures chez les embryons *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato*, notamment ceux de la couche IV. A P5, environ 70% des interneurons immatures qui expriment une protéine apparentée aux cadhérines expriment l'autre et environ 50% des interneurons immatures expriment *cdhr23* et/ou *cdhr15* ($n = 5$ embryons, **Figure 20D**).

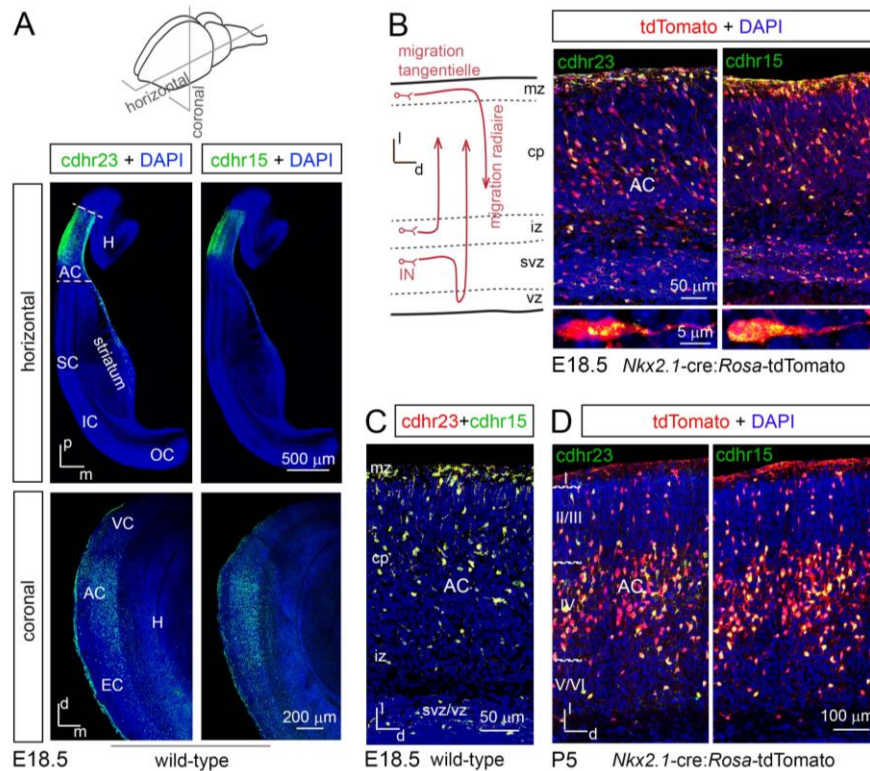


Figure 20 *Cdhr23* et *cdhr15* sont co-exprimées dans les précurseurs d'interneurons issus de la MGE du cortex auditif chez la souris. **A**, Tranches horizontales et coronales à travers le cortex auditif (AC) d'embryons sauvages (*wild-type*) à E18,5 immuno-marqués pour *cdhr23* et *cdhr15*. **B**, Schéma représentant des voies de migrations tangentielle et radiale dans le cortex en développement, et tranches coronales correspondantes dans le cortex auditif d'embryon *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato* à E18,5 immuno-marquées pour tdTomato, *cdhr23* ou *cdhr15*. **C**, Tranche coronale de cortex auditif d'embryon sauvage à E18,5 immuno-marquée pour *cdhr23* et *cdhr15*. **D**, Tranches coronales de cortex auditif de souris *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato* à P5 immuno-marquées pour tdTomato, *cdhr23* ou *cdhr15*. Noyaux cellulaires marqués en bleu (DAPI). Abréviations : néocortex (NCx) ; hippocampe (H) ; cortex orbital/insulaire/somatosensoriel/auditif (OII/S/AC) ; postérieur (p) ; latéral (l) ; dorsal (d) ; médial (m). Adapté de Libé-Philippot *et al.*, article accepté⁴¹².

En conclusion, *cdhr23* et *cdhr15* sont co-exprimées dans des précurseurs d'interneurons (j'emploierai ce terme pour désigner les progéniteurs, les neuroblastes ou les interneurons immatures) issus de la MGE, dès leur stade postmitotique dans le manteau de la MGE à E13,5, jusqu'au cortex auditif en développement. Au-delà de P7, elles ne sont plus détectées dans le télencéphale. Par ailleurs, *cdhr23* et *cdhr15* sont détectées dans les précurseurs d'interneurons du striatum et du globus pallidus.

II. *Cdhr23* et *cdhr15* sont nécessaires à l'entrée dans le cortex embryonnaire des neuroblastes GABAergiques qui les expriment, chez la souris

J'ai réalisé les mêmes immuno-marquages chez les embryons mutants homozygotes pour *Cdhr23* ou *Cdhr15* (embryons *Cdhr23*^{-/-} et embryons *Cdhr15*^{-/-}). A E14,5-E15,5, *cdhr15* n'est pas détectée dans le cortex embryonnaire d'embryons *Cdhr23*^{-/-} et *cdhr23* ne l'est pas dans le cortex embryonnaire d'embryons *Cdhr15*^{-/-}. Le rapport de fluorescence du marquage pour *cdhr23* ou *cdhr15* dans le cortex embryonnaire par rapport à celui dans le subpallium est de 1,2 ($\pm 0,07$, $n = 7$) chez les embryons sauvages, de 0,07 ($\pm 0,04$, $n = 5$) chez les embryons *Cdhr23*^{-/-} et de 0,17 ($\pm 0,05$, $n = 5$) chez les embryons *Cdhr15*^{-/-} ($p < 0,003$ pour les deux lignées). Plus particulièrement, un marquage est présent dans le striatum, comme chez les embryons sauvages et un marquage ectopique est présent dans les LGE et MGE (**Figure 21A**).

Ces résultats suggèrent que les neuroblastes synthétisant *cdhr15* ou *cdhr23* ne peuvent pas entrer dans le néocortex et qu'ils se dispersent dans le subpallium d'embryons *Cdhr23*^{-/-} et *Cdhr15*^{-/-}. Les flux de migration tangentielle dans leur ensemble étaient conservés chez les embryons mutants homozygotes, ce que révèle un immuno-marquage de la doublecortine. Par ailleurs, aucune cellule en apoptose n'est détectée à ce stade dans le subpallium (apoptose détectée par la méthode TUNEL, **Figure 22**).

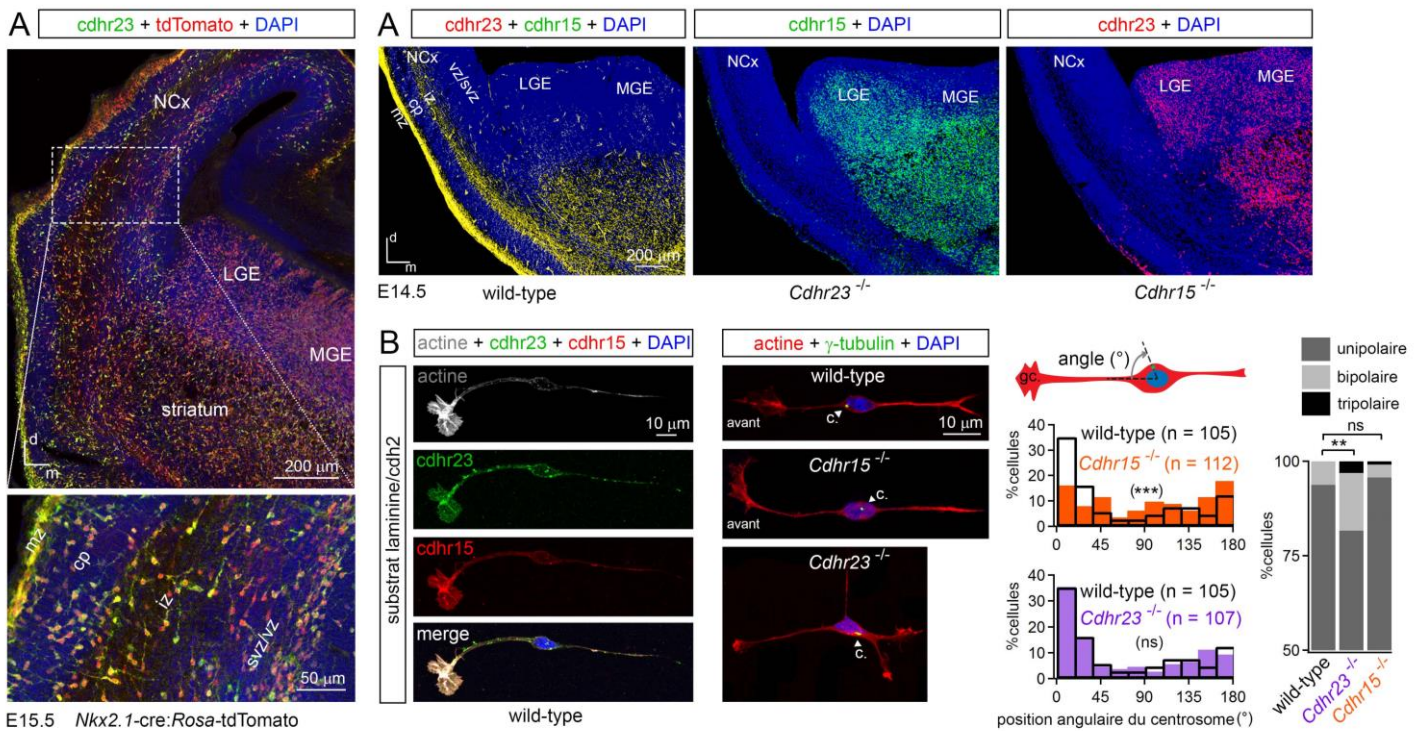


Figure 21 *Cdhr23* et *cdhr15* sont nécessaires à la migration des neuroblastes GABAergiques qui les expriment chez la souris. **A**, Tranches coronales de télencéphale d'embryons sauvages (*wild-type*), *Cdhr23*^{-/-} et *Cdhr15*^{-/-} à E14,5 immuno-marqués pour *cdhr23* et/ou *cdhr15*. **B**, Neuroblastes représentatifs issu de MGE d'embryon sauvage, *Cdhr23*^{-/-} et *Cdhr15*^{-/-} cultivés sur laminine/cdh2 immuno-marqués pour l'actine, *cdhr23* et *cdhr15* sans perméabilisation (gauche) ou immuno-marqués pour le marqueur centrosomal γ -tubuline (montré par une flèche) après perméabilisation. Les histogrammes indiquent la distribution de la position angulaire du centrosome (voir schéma) chez les cellules unipolaires (avec un seul processus) et le nombre de processus des cellules marquées pour *cdhr15* ou *cdhr23* issues d'explants de MGE d'embryons *Cdhr23*^{-/-} ou *Cdhr15*^{-/-} cultivés sur laminine/cdh2. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu (DAPI). Abréviations : lamellipode (gc). **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, non significatif (test de Kolmogorov-Smirnov pour la position du centrosome, test de Chi² pour la multipolarité). Adapté de Libé-Philippot *et al.*, article accepté⁴¹².

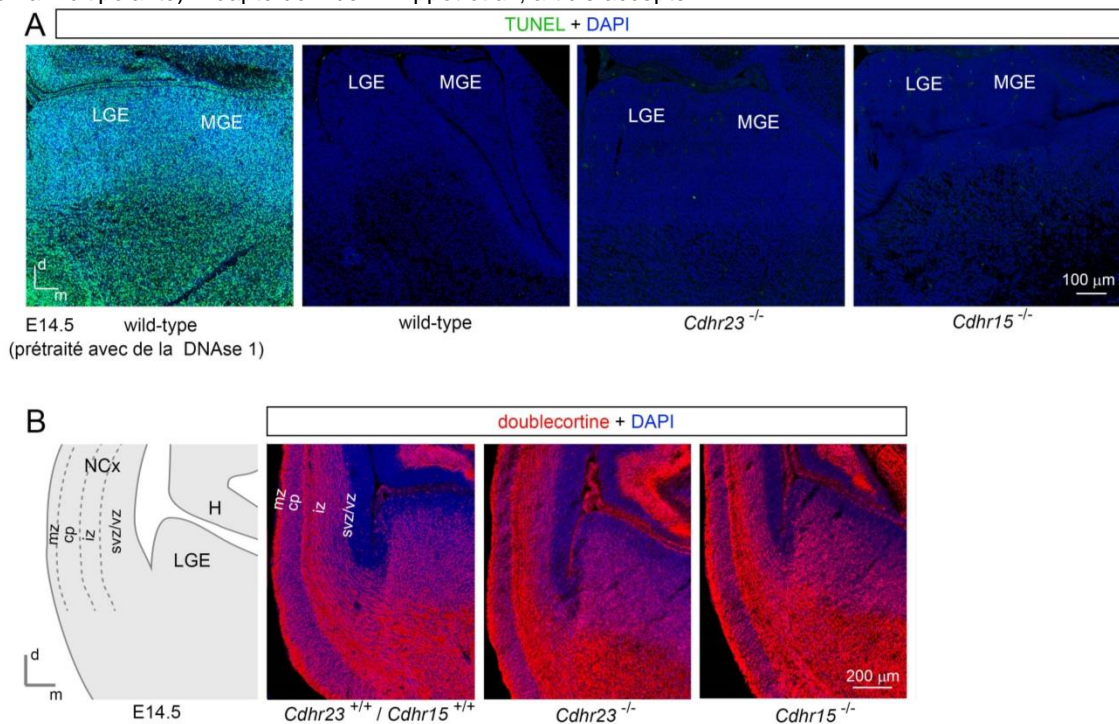


Figure 22 Préservation des flux de migration tangentielle chez les embryons des souris mutantes *Cdhr23*^{-/-} et *Cdhr15*^{-/-}. **A**, Tranches coronales de télencéphale basal d'embryons sauvage (*wild-type*), *Cdhr23*^{-/-} et *Cdhr15*^{-/-} à E14,5 marqués par la méthode TUNEL. **B**, Schéma d'une tranche coronale de télencéphale à E14,5 et les tranches correspondantes d'embryons sauvage, *Cdhr23*^{-/-} et *Cdhr15*^{-/-} immuno-marquées par le marqueur de neuroblaste en migration, doublecortine. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu (DAPI). Abréviations : néocortex (NCx) ; hippocampe (H) ; dorsal (d) ; médiale (m). Adapté de Libé-Philippot *et al.*, article accepté⁴¹².

Afin de tester l'hypothèse d'un défaut de migration, des explants de MGE à E13,5 ont été cultivés sur différents substrats synthétiques, comprenant de la laminine seule ou un mélange laminine/cdh2. Sur la laminine, la surface de migration autour des explants d'embryons mutants homozygotes est réduite, par rapport à celle autour d'explants d'embryons sauvages (2,4 fois et 2,7 fois plus faible chez les embryons *Cdhr23*^{-/-}, $n = 9$, et *Cdhr15*^{-/-}, $n = 4$, respectivement, par rapport aux embryons sauvages, $n = 7$, $p < 0,01$). Sur le mélange laminine/cdh2, la surface de migration est normale ($p > 0,4$; cf. **Méthodes**). Ce substrat permet ainsi d'étudier la migration à l'échelle cellulaire (**Figure 23A-D**).

Sur laminine/cdh2, 87% des cellules sauvages qui expriment une protéine apparentée aux cadhérines expriment l'autre. Chez les cellules issues de MGE d'embryons mutants homozygotes et chez les sauvages, *cdhr23* et *cdhr15* sont exprimées au lamellipode, le long du processus conducteur ainsi qu'autour du noyau (**Figure 23E-F**). Il s'agissait bien de marquages extracellulaires puisqu'ils sont révélant sans perméabilisation des cellules (**Figure 21B**). Afin de tester l'hypothèse selon laquelle *cdhr23* et *cdhr15* interviendraient dans le contrôle de la polarité des neuroblastes, le nombre de processus par neuroblaste a été compté et la position angulaire du centrosome a été mesurée. Les cellules issues de MGE d'embryons *Cdhr23*^{-/-} ($n = 133$ cellules) présentaient un phénotype multipolaire plus souvent que chez les sauvages ($n = 117$ cellules) ($p = 0,004$). En ce qui concerne celles issues de MGE d'embryons *Cdhr15*^{-/-} ($n = 118$ cellules), elles présentaient un phénotype unipolaire, comme chez les sauvages. En revanche, leur centrosome ($n = 112$ cellules unipolaires) n'était pas préférentiellement positionné à l'avant du noyau comme c'est le cas chez des sauvages ($n = 105$ cellules unipolaires, $p < 0,001$). Les cellules issues de MGE d'embryons *Cdhr23*^{-/-} et *Cdhr15*^{-/-} présentent donc des défauts de polarité cellulaire, mais de nature différente (**Figure 21B**).

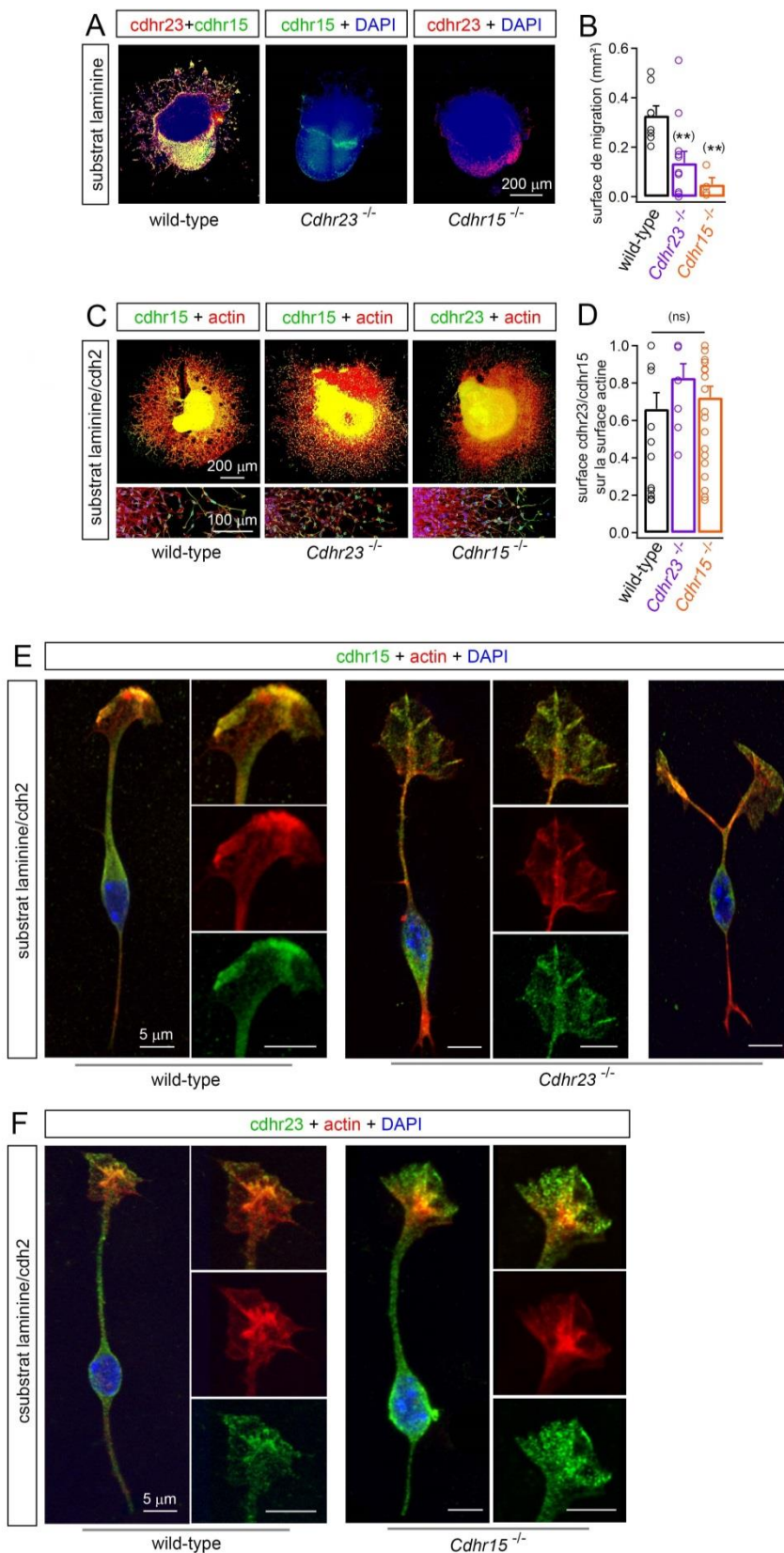


Figure 23 Expression de cdhr23 et cdhr15 dans des neuroblastes issus d'explants de MGE chez la souris. **A-B**, Explants représentatifs de MGE d'embryons sauvage (*wild-type*), *Cdhr23*^{-/-} et *Cdhr15*^{-/-} à E13,5 cultivés 24 heures sur laminine (**A**) et quantification de la surface de migration (**B**). **C-D**, Explants représentatifs de MGE d'embryons sauvage, *Cdhr23*^{-/-} et *Cdhr15*^{-/-} à E13,5 cultivés 19 heures sur laminine/cdh2 (**C**, avec vues zoomées sur laminine/cdh2 en dessous) et la quantification de la surface de migration des neuroblastes cdhr23 ou cdhr15 relative à celle marquée par l'actine (**D**). Neuroblastes représentatifs issus de cultures de MGE d'embryons sauvages (**E-F**), *Cdhr23*^{-/-} (**E**) et *Cdhr15*^{-/-} (**F**) à E13,5 cultivés sur laminine/cdh2 immuno-marqués pour cdhr23, cdhr15 et l'actine. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu (DAPI). Les données sont représentées par des moyennes + l'écart-type de la moyenne (SEM) avec les valeurs individuelles (cercles) ; **, $p < 0.01$; ns, non significatif (test bilatéral non-paramétrique de Mann-Whitney). Adapté de Libé-Philippot *et al.*, article accepté⁴¹².

En conclusion, *cdhr23* et *cdhr15* sont co-exprimées par une sous-population de neuroblastes GABAergiques, au niveau de leurs lamellipode et processus conducteur. Les neuroblastes exprimant *cdhr15* ou *cdhr23* chez les embryons *Cdhr23^{-/-}* et *Cdhr15^{-/-}*, respectivement, n'entreraient pas dans le cortex de ces embryons, sans entrer en apoptose, ce qui est cohérent avec les défauts de polarité cellulaire observés *in vitro*. Ces défauts ne concernent pas la grande majorité des neuroblastes GABAergiques mais *a priori* seulement la sous-population exprimant *cdhr15* et/ou *cdhr23*.

III. Les souris mutantes pour *Cdhr23* et *Cdhr15* ont moins d'interneurones à parvalbumine dans leur cortex auditif et sont prédisposées aux crises audiogènes

Les interneurones issus de la MGE pouvant être à parvalbumine ou à somatostatine, j'ai quantifié chez les souris mutantes homozygotes pour *Cdhr23* ou *Cdhr15* le nombre de ces interneurones dans le cortex auditif, où j'observais un co-marquage pour *cdhr23* et *cdhr15* à E18,5. Chez des animaux âgés de trois semaines, le nombre d'interneurones à parvalbumine est fortement réduit (d'un facteur 2 chez les animaux *Cdhr23*^{-/-}, $p = 0,008$, et 4.2 fois chez les animaux *Cdhr15*^{av-3J/av-3J}, $p = 0,004$, par rapport aux animaux sauvages, $n = 5$ animaux pour chaque génotype) mais pas le nombre des interneurones à somatostatine ($p = 0,14-0,15$, $n = 8$ animaux pour chaque génotype, excepté pour *Cdhr23*^{-/-} où $n = 7$) (**Figure 24A-B, E-F**). Ces diminutions du nombre d'interneurones à parvalbumine n'étaient pas accompagnées d'une différence d'épaisseur de la plaque corticale ou de surface du cortex auditif ($p > 0,44$, $n = 5$ pour la surface, $n = 8$ pour l'épaisseur).

Etant donné que les animaux *Cdhr23*^{-/-} et *Cdhr15*^{av-3J/av-3J} ont une surdité périphérique profonde, nous ne pouvions pas formellement déterminer si ce défaut était dû à une conséquence de la surdité périphérique, à la conséquence de l'absence d'expression de *cdhr15* ou *cdhr23* au cours du développement du télencéphale, ou une conséquence des deux phénomènes. Je me suis intéressé aux animaux mutants hétérozygotes pour *Cdhr23* ou *Cdhr15*, qui ne présentent pas de défauts d'audition périphérique (mesurés par **potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral** – PEAs – ou **des otoémissions acoustiques** – OEAs – **des produits de distorsion**) (**Figure 25**). Ces animaux présentent aussi une diminution du nombre d'interneurones à parvalbumine dans le cortex auditif (1,6-1,8 fois moins en moyenne par rapport aux animaux sauvages, $n = 9$, $p < 0,001$), mais pas de celui des interneurones à somatostatine ($n = 9$, $p = 0,22$) (**Figure 24C-D, G**).

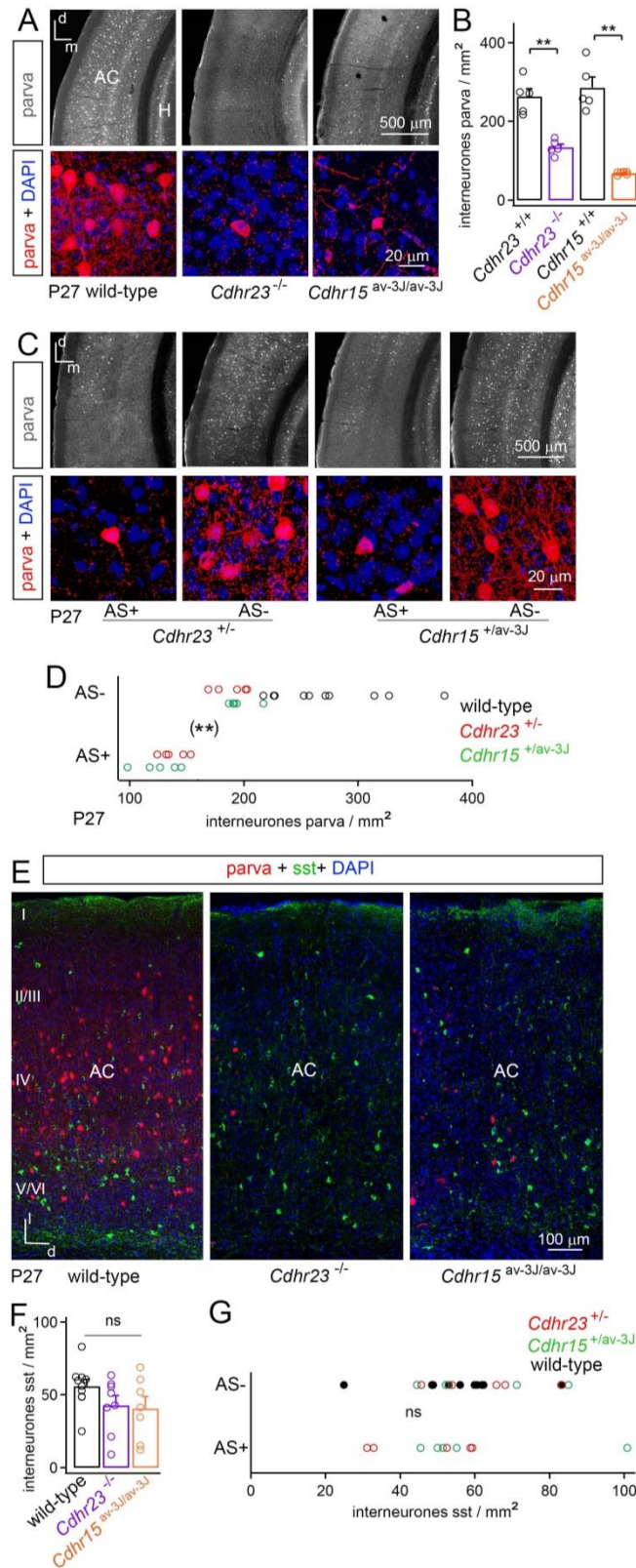


Figure 24 Les souris mutantes pour *Cdhr23* et *Cdhr15* ont un nombre réduit d'interneurones produisant la parvalbumine dans leur cortex auditif. **A-D**, Densité des interneurones à parvalbumine dans le cortex auditif (AC) à P27 de souris sauvages (*wild-type*), *Cdhr23*^{-/-} et *Cdhr15*^{av-3J/av-3J} (**A-B**), dans l'AC de souris *Cdhr23*^{+/-} et *Cdhr15*^{+/av-3J} manifestant ou non des crises audiogènes (AS+/AS-) (**C-D**); tranches coronales de cortex auditif immuno-marquées pour la parvalbumine avec des vues zommées en dessous (**A, C**). **E**, Tranches coronales de cortex auditif immuno-marquées pour la parvalbumine et la somatostatine. **F-G**, Densité des interneurones à somatostatine dans l'AC à P27 de souris sauvages, *Cdhr23*^{-/-} et *Cdhr15*^{av-3J/av-3J} (**F**), *Cdhr23*^{+/-} et *Cdhr15*^{+/av-3J} manifestant ou non des crises audiogènes (AS+/AS-) (**G**). Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu (DAPI). Les données sont représentées par des moyennes + SEM avec les valeurs individuelles (cercles), **, $p < 0,01$; ns, non significatif (test bilatéral non-paramétrique de Mann-Whitney). Adapté de Libé-Philippot *et al.*, article accepté⁴¹².

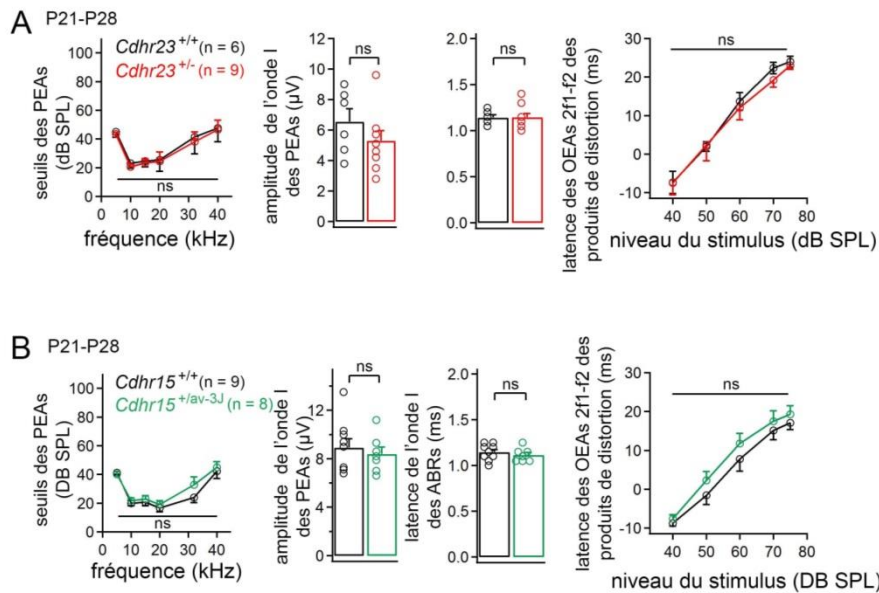


Figure 25 Les souris *Cdhr23*^{+/-} et *Cdhr15*^{+/av-3J} ont des PEAs et des OEs des produits de distorsion normaux. Seuils PEAs, amplitude de l'onde I des PEAs, latence de l'onde I des PEAs, niveau des OEs des produits de distorsion (2f₁-f₂) enregistrés pour f₁=8,3 kHz, f₂=10kHz, chez les souris sauvages, *Cdhr23*^{+/-} (A) et *Cdhr15*^{+/av-3J} (B). Les données sont représentées par des moyennes + SEM avec les valeurs individuelles (cercles) ; ns, non significatif (test bilatéral non-paramétrique de Mann-Whitney). Adapté de Libé-Philippot *et al.*, article accepté⁴¹².

L'audition périphérique des animaux *Cdhr23*^{+/-} ou *Cdhr15*^{+/av-3J} étant normale, je les ai exposés à un son de forte intensité (8 – 15 kHz, 110 dB SPL). Certaines souris *Cdhr23*^{+/-} ou *Cdhr15*^{+/av-3J} ont manifesté les signes de crises audiogènes (course folle, phase tonique, phase clonique) au cours de leur troisième semaine postnatale, la plupart d'entre elles vers P27. 51% des animaux *Cdhr23*^{+/-} ($n = 49$) et 38% des animaux *Cdhr15*^{+/av-3J} ($n = 50$) ont manifesté les signes de crises audiogènes, alors qu'aucun animal sauvage des mêmes portées n'a manifesté de tels signes ($n = 36-40$, $p < 0,0001$). En dénombrant les interneurons à parvalbumine chez les souris *Cdhr23*^{+/-} ou *Cdhr15*^{+/av-3J}, celles qui avaient manifestés des crises audiogènes présentaient la diminution la plus importante du nombre d'interneurones à parvalbumine (d'un facteur d'au moins 1,6) (**Figure 24D**). Notons que les animaux ne manifestaient plus de crise audiogène au-delà de P35. De plus, il n'y avait de différence dans la proportion des animaux qui manifestaient des crises audiogènes en comparant les mâles et les femelles (10 sur 20 femelles et 11 sur 23 mâles et pour la lignée *Cdhr23*, $p = 0,87$; 6 sur 20 femelles et 13 sur 24 mâles pour la lignée *Cdhr15*, $p = 0,19$) d'une part, et d'autre part, les animaux pour qui la mutation provenait du parent mâle ou femelle (14 sur 25 pour ceux dont la mutation provenait du parent femelle et 10 sur 18 quand elle provenait du parent mâle pour la lignée *Cdhr23*, $p = 0,77$; 6 sur 15 pour ceux

dont la mutation provenait du parent femelle et et 13 sur 29 quand elle provenait du parent mâle pour la lignée *Cdhr15*, $p = 0,98$). Tous les animaux mutants doubles hétérozygotes (*Cdhr23*^{+/-}/*Cdhr15*^{+/av-3J}) ont manifesté des crises audiogènes ($p < 0,01$ par rapport aux *Cdhr23*^{+/-}, $p < 0,05$ par rapport aux *Cdhr15*^{+/av-3J}; $n = 10$; donnée non publiée). De plus, je n'ai pas détecté de diminution du nombre d'interneurones à parvalbumine en comparant les animaux *Cdhr23*^{+/-} ou *Cdhr15*^{+/av-3J}, manifestant ou non des crises audiogènes, dans leurs cortex moteur, visuel ou somatosensoriel (**Figure 26**).

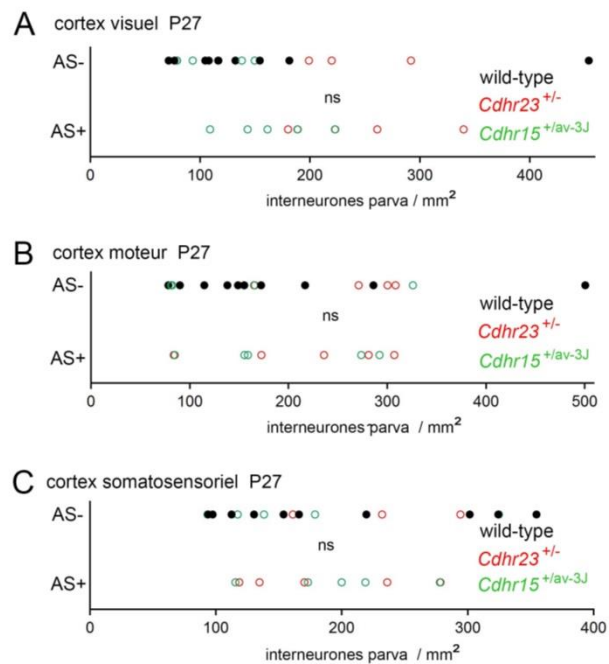


Figure 26 La diminution du nombre d'interneurones produisant la parvalbumine est restreinte au cortex auditif chez les souris mutantes *Cdhr23*^{+/-} et *Cdhr15*^{+/av-3J}. Quantification de la densité d'interneurones à parvalbumine dans les cortex visuel (A), moteur (B) et somatosensoriel (C) d'animaux sauvages (*wild-type*), *Cdhr23*^{+/-} et *Cdhr15*^{+/av-3J}, manifestant ou non des crises audiogènes (AS+ ou AS-). Les données sont représentées par des moyennes + SEM avec les valeurs individuelles (cercles) ; ns, non significatif (test bilatéral non-paramétrique de Mann-Whitney). Adapté de Libé-Philippot *et al.*, article accepté⁴¹².

En conclusion, les souris mutantes pour *Cdhr23* ou *Cdhr15*, à l'état homozygote et hétérozygote, présentent une diminution du nombre d'interneurones à parvalbumine, mais pas des interneurones à somatostatine, dans leur cortex auditif. Cette diminution est corrélée chez les animaux hétérozygotes à une manifestation de crises audiogènes. Chez les animaux hétérozygotes, je n'ai pas observé de diminution du nombre d'interneurones à parvalbumine dans les cortex moteur, visuel ou somatosensoriel.

IV. L'invalidation conditionnelle de *Cdhr23* et *Cdhr15* dans la MGE ou de *Cdhr15* dans le cortex auditif est suffisante pour entraîner une diminution du nombre d'interneurones à parvalbumine dans le cortex auditif et une prédisposition aux crises audiogènes

Des souris *Cdhr23*^{lox/lox} et *Cdhr15*^{lox/lox} ont été croisées avec d'autres *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato* ou *Nkx2.1-cre* (animaux que je nommerai ***Cdhr23* cKO** et ***Cdhr15* cKO**), afin d'invalider l'expression de *Cdhr23* ou *Cdhr15* dès le stade progéniteur dans la MGE, et donc avant l'expression de *cdhr23* et *cdhr15* dans le manteau de la MGE. Notons que je ne détecte pas de tdTomato dans l'organe de Corti à l'âge de trois semaines, ce qui indique que *Nkx2.1* n'y est pas exprimé avant ce stade (donnée non montrée, non publiée).

A l'âge de trois semaines, 87% des animaux *Cdhr23* cKO ($n = 15$) et 72% des animaux *Cdhr15* cKO ($n = 11$) ont manifesté des signes de crises audiogènes, alors qu'aucun animal *Cdhr23*^{lox/lox} ou *Cdhr15*^{lox/lox} (animaux « contrôles ») des mêmes portées n'en a manifesté (*Rosa-tdTomato* ou non, $n = 14$ pour *Cdhr23* et $n = 15$ pour *Cdhr15*, $p < 0,001$).

En ce qui concerne le nombre d'interneurones issus de la MGE dans le cortex auditif de ces animaux (interneurones synthétisant tdTomato), il est 1,5 fois plus faible chez les animaux *Cdhr23* cKO et *Cdhr15* cKO par rapport aux animaux contrôles ($n = 5$ et $p < 0,01$ pour les deux lignées), avec une diminution du nombre d'interneurones à parvalbumine d'un facteur entre 2,2 et 2,4 pour les lignées *Cdhr23* cKO et *Cdhr15* cKO, respectivement ($n = 5$ et $p < 0,01$ pour les deux lignées). Ni le nombre des interneurones à somatostatine ni celui de ceux synthétisant seulement la protéine tdTomato n'est modifié ($p > 0,69$ pour la lignée *Cdhr23* et $p > 0,15$ pour la lignée *Cdhr15*, $n = 5$) (**Figure 27**).

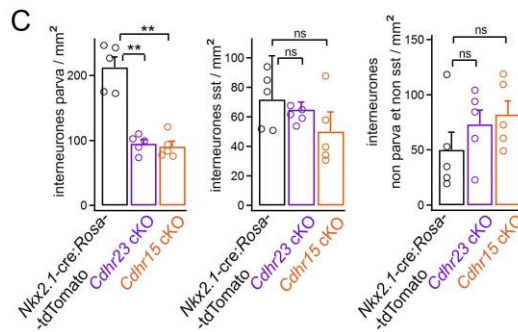
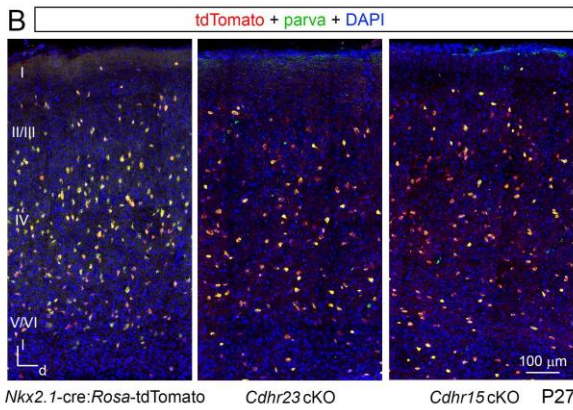
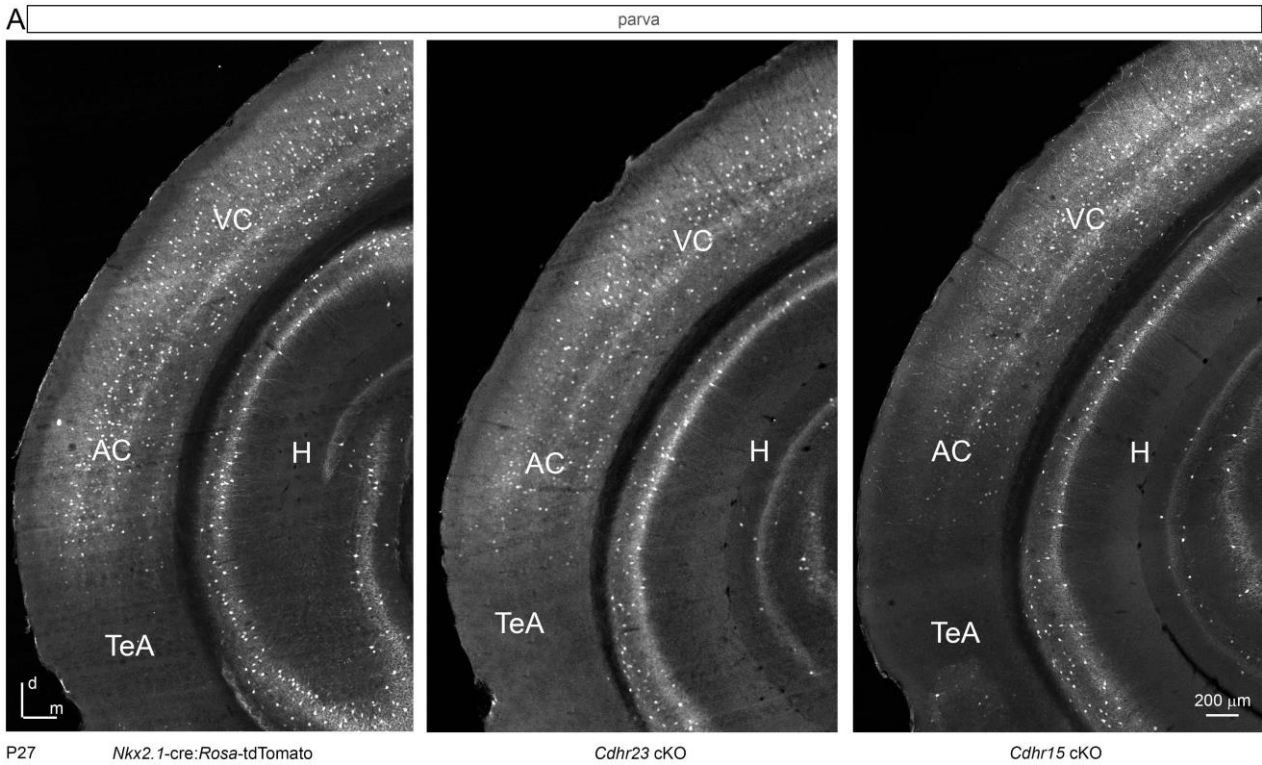


Figure 27. La délétion conditionnelle de *Cdhr15* et *Cdhr23* dans la MGE est suffisante pour induire une disposition aux crises audiogènes et une diminution du nombre d'interneurons produisant la parvalbumine dans le cortex auditif. **A**, Grandes vues de tranches coronales comprenant le cortex auditif (AC), le cortex visuel (VC), l'aire associative temporale (TeA) ainsi que l'hippocampe (H) de souris *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato*, *Cdhr23 cKO* (*Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato:Cdhr23^{lox/lox}*) et *Cdhr15 cKO* (*Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato:Cdhr15^{lox/lox}*) à P27 immuno-marquées pour la parvalbumine. **B**, Tranches coronales de cortex auditif de souris *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato*, *Cdhr23 cKO* et *Cdhr15 cKO* à P27 immuno-marquées pour tdTomato et la parvalbumine. **C**, Densité des interneurons synthétisant tdTomato (et non la parvalbumine ou la somatostatine), la parvalbumine et la somatostatine dans le cortex auditif de souris *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato*, *Cdhr23 cKO* et *Cdhr15 cKO* à P27. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu (DAPI). Les données sont représentées par des moyennes + SEM; **, $p < 0,01$; ns, non significatif (test bilatéral non-paramétrique de Mann-Whitney). Adapté de Libé-Philippot *et al.*, article révisé⁴¹².

Etant donné que la migration tangentielle est altérée chez les animaux mutants homozygotes pour *Cdhr23* ou *Cdhr15*, il est impossible d'étudier le rôle de *cdhr23* et *cdhr15* après E14,5. J'ai ainsi réalisé une invalidation conditionnelle *in situ* de *Cdhr15*, en injectant un vecteur lentiviral synthétisant la recombinaise cre couplée à la protéine fluorescente GFP dans le cortex auditif d'animaux *Cdhr15^{lox/lox}* à P1 (animaux injectés LV-*Cre-GFP*).

A P5, *cdhr23* et *cdhr15* ne sont plus détectées dans le cortex auditif, alors que c'est toujours le cas chez des animaux sauvages LV-*cre-GFP*. A ce stade, *casp3* est détectée dans le cortex auditif des animaux *Cdhr15^{lox/lox}* LV-*cre-GFP* mais pas dans celui d'animaux sauvages LV-*cre-GFP*. En particulier, *casp3* est localisée dans la couche IV, dans les interneurons synthétisant *dlx5* (**Figure 28A-B**).

A trois semaines, ces animaux, dont l'audition périphérique mesurée par PEAs était normale (**Figure 28F**), ont tous manifesté des signes de crises audiogènes ($n = 12$) alors qu'aucun animal sauvage LV-*cre-GFP* n'en a manifestés ($n = 7$, $p < 0,0001$). J'ai réalisé d'autres contrôles, et aucun de ceux-là n'a manifesté de crises audiogènes : des souris *Cdhr15^{lox/lox}* non injectées ($n = 8$, $p < 10^{-4}$), des souris *Cdhr15^{lox/lox}* injectées à P1 avec un vecteur lentiviral n'exprimant que la GFP (LV-*cre-GFP*) ($n = 7$, $p < 10^{-4}$), des souris *Cdhr15^{lox/lox}* LV-*cre-GFP* injectées à P10 ($n = 8$, $p < 10^{-4}$) et des souris *Cdhr15^{lox/lox}* LV-*cre-GFP* injectées dans le cortex dorsal à P1 ($n = 9$, $p < 10^{-4}$). Notons que je n'ai pas réussi à obtenir ces résultats en invalidant *Cdhr23*, où un marquage pour *cdhr23* et *cdhr15* subsiste à P5 (donnée non publiée et non montrée).

Dans le cortex auditif des animaux LV-*cre-GFP* injectés à P1 ($n = 6$), le nombre d'interneurones à parvalbumine était 2,6 fois plus faible que celui des animaux sauvages LV-*cre-GFP* injectés à P1 ($n = 6$, $p = 0,004$) (**Figure 28D-E**). Notons que je ne détecte pas la GFP en dehors du cortex auditif (donnée non montrée, non publiée).

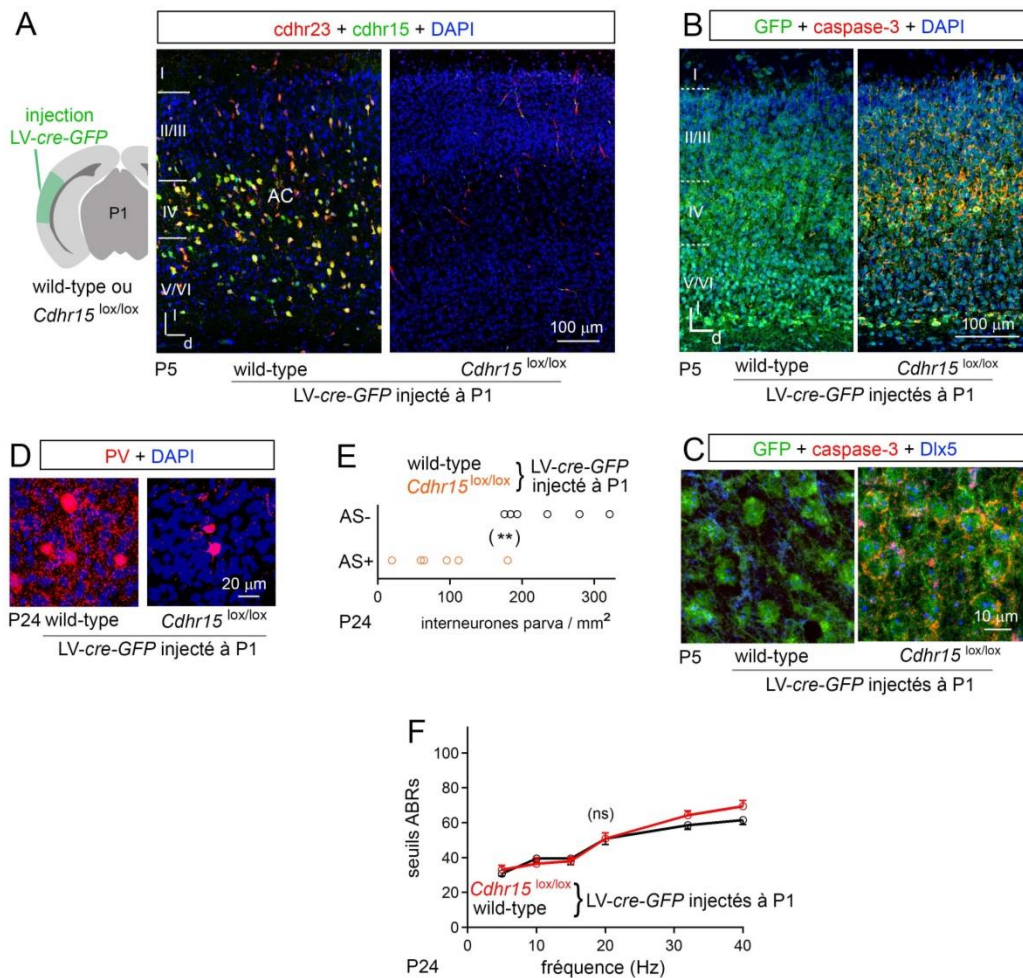


Figure 28 La délétion *in situ* conditionnelle de *Cdhr15* est suffisante pour induire la manifestation de crises audiogènes et une diminution du nombre d'interneurones produisant la parvalbumine dans le cortex auditif. **A-C**, protocole d'injection du vecteur lentiviral dans le lobe temporal à P1 ; tranches coronales de cortex auditif (AC) à P5 de souris sauvages (*wild-type*) et *Cdhr15*^{lox/lox} LV-cre-GFP injectées à P1, immunomarquées pour *cdhr23* et *cdhr15* (**A**), la GFP et la caspase-3, participant à l'apoptose (**B**), avec une vue zoomée dans la couche néocorticale IV d'une tranche immuno-marquée pour la GFP, la caspase-3 et *dlx5* (**C**). **D-E**, Vue zoomée d'interneurones à parvalbumine dans des tranches corticales à P24 de souris sauvages et *Cdhr15*^{lox/lox} LV-cre-GFP injectés à P1 (**D**), avec une quantification du nombre d'interneurones à parvalbumine chez ces souris (**E**, les animaux *Cdhr15*^{lox/lox} LV-cre-GFP injectés à P1 manifestent tous des signes de crises audiogènes, ils sont notés AS+ ; aucun animal sauvage LV-cre-GFP injectés à P1 n'en a manifestés, ils sont notés AS-). **F**, seuils des PEAs mesurés à P24 chez les animaux sauvages et *Cdhr15*^{lox/lox} LV-cre-GFP injectés à P1. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu (DAPI), sauf en **C**. Les données sont représentées par des moyennes + SEM avec les valeurs individuelles (cercles) ; **, $p < 0,01$, ns, non significatif (test bilatéral non-paramétrique de Mann-Whitney). Adapté de Libé-Philippot *et al.*, article accepté⁴¹².

En conclusion, l'inactivation conditionnelle de *Cdhr15* et *Cdhr23* confirme leur intervention dans le développement des interneurones à parvalbumine du cortex auditif, mais pas dans celui des interneurones à somatostatine. L'inactivation conditionnelle *in situ* de *Cdhr15* révèle un rôle postnatal de *cdhr15* dans la survie des interneurones. Notons que ces invalidations conditionnelles (dans le télencéphale ou le cortex auditif) sont suffisantes pour induire une manifestation de crises audiogènes.

V. *Adgrv1* est impliqué dans le développement des neuroblastes synthétisant *cdhr23* et *cdhr15*

Afin de déterminer si d'autres gènes de surdité pourraient être impliqués dans le développement du télencéphale, j'ai testé la disposition aux crises audiogènes d'autres lignées murines présentes au laboratoire. J'ai observé que 100% des souris mutantes homozygotes pour *Adgrv1*, *stéréociline* et *otogéline* (deux gènes responsables de surdité modérée qui codent pour des glycoprotéines extracellulaires associées à des membranes acellulaires de la cochlée et à des liens inter-stéréociliaires^{415,416}), sont disposées aux crises audiogènes, alors qu'aucune des souris mutantes hétérozygotes des mêmes portées ne le sont ($n = 30$, $p < 10^{-13}$) (donnée non publiée pour *stéréociline* et *otogéline*). Ce résultat était déjà connu pour *Adgrv1* (**Introduction, Partie VD**). Le nombre d'interneurones à parvalbumine est 3,1 fois plus faible dans le cortex auditif des souris *Adgrv1*^{-/-} ($n = 5$, $p < 0,008$), mais celui des interneurones à somatostatine est inchangé ($p = 0,2$), par rapport aux animaux sauvages ($n = 5$) (**Figure 29A-D**).

J'ai détecté *adgrv1* par immuno-marquage dans le télencéphale dès E12, et son expression est très large à E13,5-E14,5 (**Figures 18 et 29E**). En particulier, *adgrv1* est présent à E13,5 dans la zone exprimant MKI67 dans la MGE (**Figure 29G**). Le marquage *adgrv1* est peu associé à tdTomato chez les embryons *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato* à E14,5 et E18,5 (**Figure 29E, H**). A E18,5, le marquage *adgrv1* colocalise dans le cortex auditif avec la *nestine*, marqueur de la glie radiaire (**Figure 29I**). Notons que j'ai détecté la *stéréociline*, l'*otogéline* et la myosine-VIIa dans le télencéphale embryonnaire, ainsi qu'*otogéline-like*, une autre protéine extracellulaire présente dans la cochlée et dont le gène correspondant est responsable de surdité modérée⁴¹⁷, dans le cortex auditif après la naissance (données non publiées et non montrées).

Chez les embryons mutants homozygotes pour *Adgrv1*, le marquage pour *cdhr23* et *cdhr15* est diminué en intensité dans le néocortex, avec une diminution du ratio de fluorescence entre le cortex et le subpallium de 34% par rapport aux embryons sauvages ($n = 7$, $p < 0,001$) (**Figure 29F**). Notons qu'il n'y a pas de marquage ectopique pour *cdhr23* et *cdhr15* dans la LGE et la MGE.

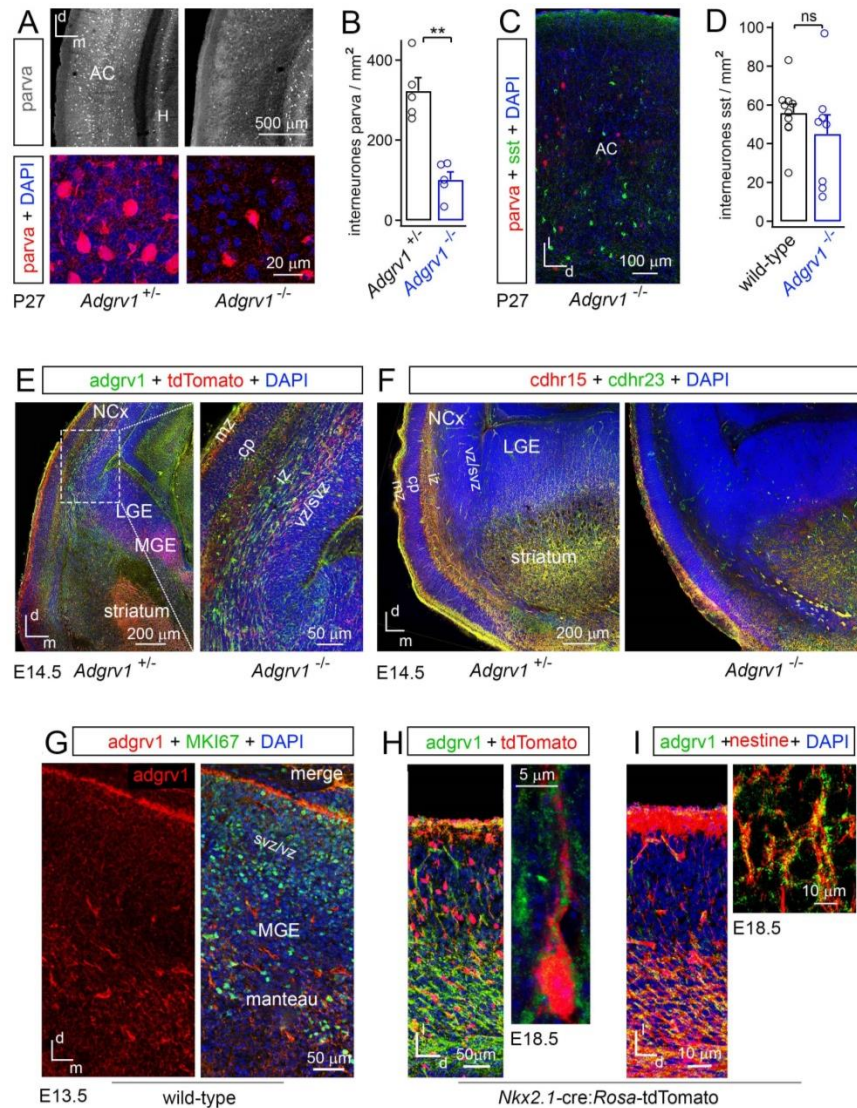


Figure 29 Défaits de développement des neuroblastes GABAergiques co-exprimant *cdhr23* et *cdhr15*, et des interneurons produisant la parvalbumine du cortex auditif chez les souris mutantes *Adgrv1*^{-/-}. **A-B**, Tranches coronales de cortex auditif (AC) de souris *Adgrv1*^{+/-} et *Adgrv1*^{-/-} à P27 immuno-marquées pour la parvalbumine, avec des vues zoomées en dessous (**A**), ainsi que la quantification de la densité des interneurons à parvalbumine correspondante (**B**). **C-D**, Tranches coronales de cortex auditif (AC) de souris *Adgrv1*^{+/-} et *Adgrv1*^{-/-} à P27 immuno-marquées pour la parvalbumine et la somatostatine (**C**), ainsi que la quantification de la densité des interneurons à somatostatine correspondante (**D**). **E**, Tranche coronale de télencéphale d'embryons *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato* à E14,5, immuno-marquées pour tdTomato et *adgrv1* (vue zoomée à droite). **F**, Tranches coronales de télencéphale d'embryons *Adgrv1*^{+/-} et *Adgrv1*^{-/-} à E14,5 immuno-marquées pour *cdhr23* et *cdhr15*. **G**, Vue zoomée d'une tranche coronale de MGE d'un embryon sauvage (*wild-type*) à E13,5, immuno-marquée pour *adgrv1* et MKI67. **H-I**, tranche coronale de l'AC d'embryon *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato* à E18,5, immuno-marquée pour tdTomato et *adgrv1* (**H**, avec une vue zoomée) et *adgrv1* et la nestine, un marqueur de glie radiaire (**I**, avec une vue zoomée). Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu (DAPI). Abréviations : néocortex (NCx) ; dorsal (d) ; médial (m) ; latéral (l). Les données sont représentées par des moyennes + SEM avec les valeurs individuelles (cercles) ; **, $p < 0,01$; ns, non significatif (test bilatéral non-paramétrique de Mann-Whitney). Adapté de Libé-Philippot *et al.*, article accepté⁴¹².

Etant donné qu'*adgrv1* n'est pas localisé dans les neuroblastes issus de la MGE, il est possible qu'il joue un rôle extrinsèque sur ces derniers. Pour tester cette hypothèse, on été réalisées des greffes isochroniques d'explants de MGE exprimant la protéine fluorescente rouge RFP dans des tranches de télencéphale d'embryons *Adgrv1*^{-/-} à E14,5. Après 24 heures de culture, la surface de migration des cellules exprimant la RFP et la *cdhr23* a été mesurée. Cette surface de migration n'était pas différente entre les tranches *Adgrv1*^{+/-} et *Adgrv1*^{-/-}. En revanche, la surface de migration pour les cellules exprimant *cdhr23* était réduite de moitié ($n = 8, p < 0,001$), suggérant un rôle direct ou indirect d'*adgrv1* dans la migration de la population de neuroblastes exprimant *cdhr23* et *cdhr15* (donnée non publiée, **Figure 30A-B**).

J'ai réalisé les mêmes expériences *in vitro* que celles réalisées pour *cdhr23* et *cdhr15* (**Partie II**), à partir d'explants de MGE issues d'embryons *Adgrv1*^{YFP/YFP} (ils produisent la protéine fluorescente jaune YFP au lieu d'*adgrv1* ; ils sont donc analogues à des embryons *Adgrv1*^{-/-}). Il n'apparaît pas de différence de surface de migration sur la laminine, sur le mélange laminine/*cdh2*, ni d'anomalie de position du centrosome ($n = 5$ animaux et 100 cellules considérées, $p > 0,22$) (donnée non publiée, **Figure 30C-E**).

En conclusion, *adgrv1* intervient dans la migration tangentielle des neuroblastes synthétisant *cdhr23* et *cdhr15*, *a priori* de manière extrinsèque à ces neuroblastes. Les animaux *Adgrv1*^{-/-} présentent une diminution du nombre d'interneurones à parvalbumine dans leur cortex auditif et sont prédisposés aux crises audiogènes. Il est possible que nous puissions étendre ces conclusions à d'autres protéines détectées dans le télencéphale en développement et dont l'absence de certaines entraîne une disposition aux crises audiogènes, par exemple la stéréociline, l'otogéline, l'otogéline-like et la myosine-VIIa.

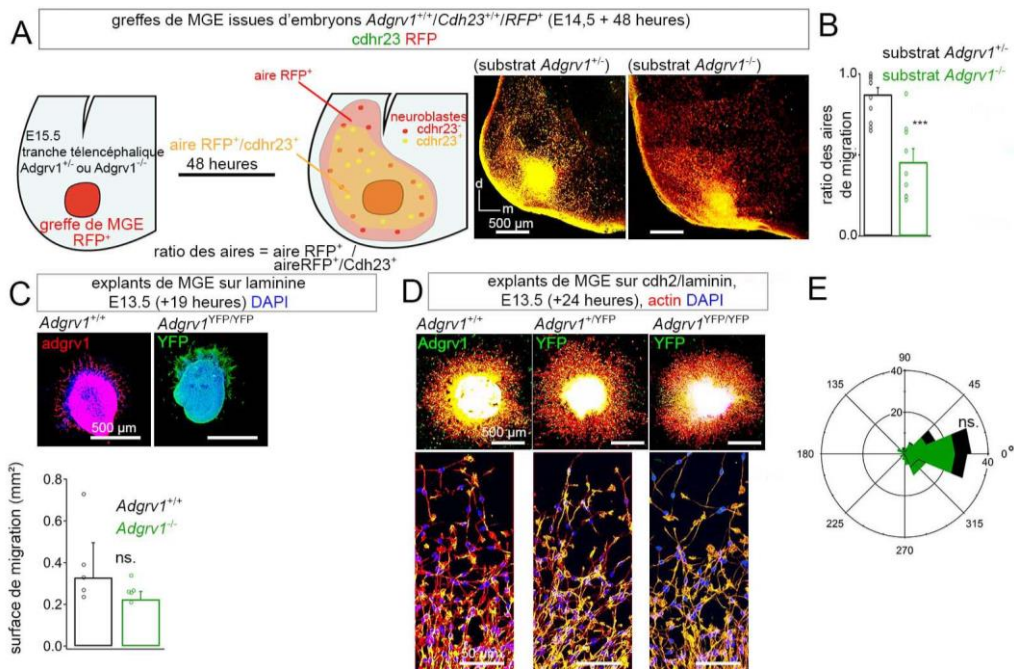


Figure 30 *Adgrv1* est impliqué dans la migration des neuroblastes GABAergiques *cdhr23*. **A-B**, Schéma représentant le protocole expérimental de greffe d'explant de MGE *RFP*⁺ à E14,5 dans des tranches télencéphaliques isochroniques *Adgrv1*^{+/+} ou *Adgrv1*^{-/-} et tranches correspondantes immuno-marquées pour *cdhr23* et la *RFP* (**A**), ainsi que la quantification correspondante du ratio de l'aire de migration marquée pour *cdhr23* sur celle marquée pour la *RFP* (**B**). **C**, Explants de MGE issues d'embryons à E13,5 *Adgrv1*^{+/+} et *Adgrv1*^{YFP/YFP} (exprimant la *YFP* au lieu d'*adgrv1*) sur la laminine et la quantification de la surface de migration. **D-E**, Explants de MGE issues d'embryons à E13,5 *Adgrv1*^{+/+}, *Adgrv1*^{YFP/YFP} et *Adgrv1*^{YFP/YFP} sur laminine/*cdh2* (avec des vues zoomées) et la quantification de la surface de migration (**D**) et la distribution de la position angulaire du centrosome chez les neuroblastes issus d'explants *Adgrv1*^{+/+} et *Adgrv1*^{YFP/YFP}. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu (DAPI). Abréviations : dorsal (**d**) ; médial (**m**). Les données sont représentées par des moyennes + l'erreur type moyenne (SEM) avec les valeurs individuelles (cercles) ; ***, $p < 0,001$; ns, non significatif (test bilatéral non-paramétrique de Mann-Whitney). Données non publiées.

VI. Cdhr23, cdhr15 et adgrv1 présentent des profils d'expression similaires dans le télencéphale embryonnaire de macaque

J'ai réalisé des immuno-marquages pour cdhr23, cdhr15 et adgrv1 dans le télencéphale d'embryons de macaque afin de déterminer si leur expression est conservée chez les primates (les épitopes visés par nos anticorps sont conservés chez le macaque).

A E63, les trois protéines sont détectées dans la MGE, dans sa zone ventriculaire, et dans son manteau en ce qui concerne cdhr23 et cdhr15. A E85, elles sont détectées dans le cortex auditif, notamment dans la zone sous-ventriculaire externe corticale et le sous-plateau, et pour adgrv1, dans la zone ventriculaire. Plus particulièrement, cdhr23 et cdhr15 colocalisent avec dlx5, mais pas adgrv1, qui colocalise avec la nestine dans la zone sous-ventriculaire externe corticale (**Figures 31 et 32**).

En conclusion, cdhr23, cdhr15 et adgrv1 présentent des marquages analogues chez le macaque, dans la MGE et dans le cortex auditif.

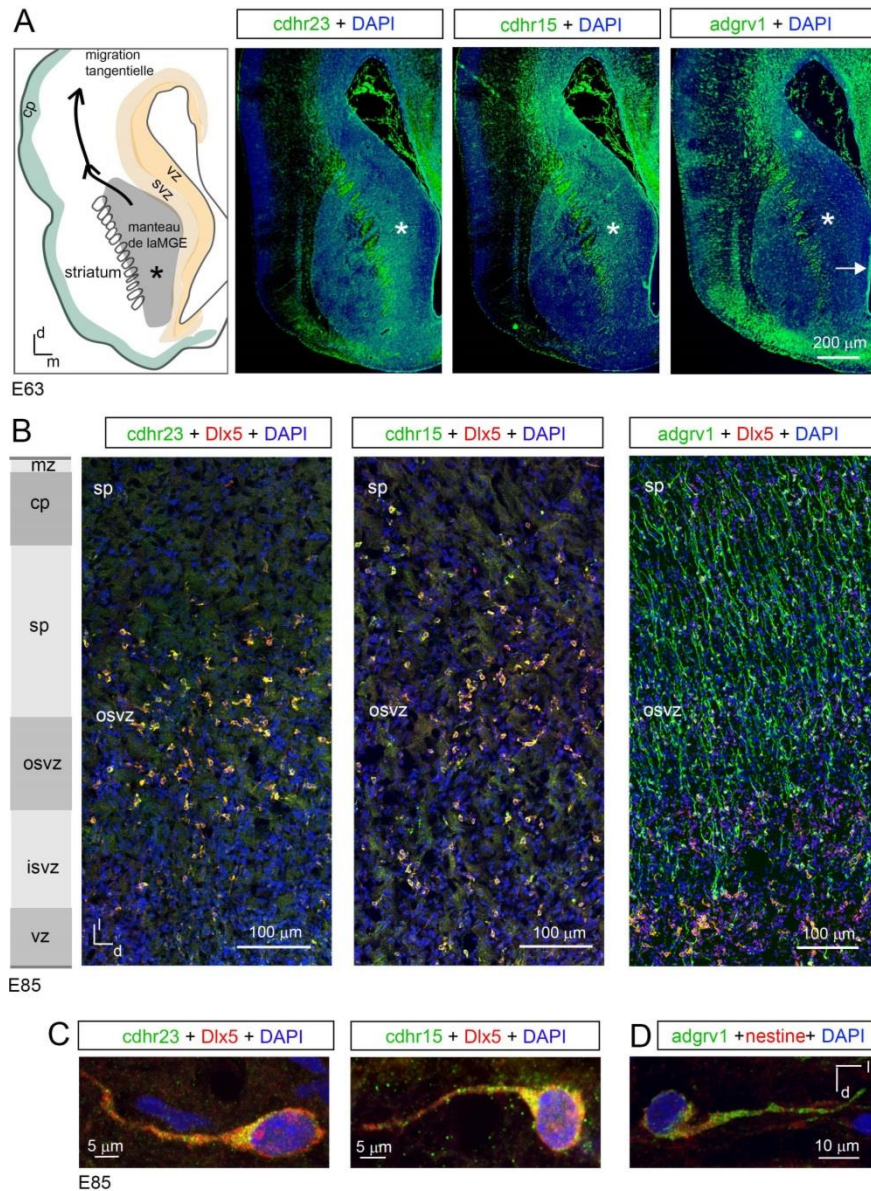


Figure 31 Conservation de l'expression de cdhr23, cdhr15, et adgrv1 dans la MGE et le cortex auditif d'embryons de macaque. **A**, Schéma d'une tranche coronale de télencéphale de macaque à E63 et les tranches correspondantes immuno-marquées pour cdhr23, cdhr15 et adgrv1. Le manteau de la MGE est indiqué par un astérisque et la zone ventriculaire de la MGE par une flèche. **B**, Schéma d'une tranche sagittale de cortex auditif de macaque à E85 et les tranches correspondantes immuno-marquées pour dlx5 et cdhr23, cdhr15 ou adgrv1. **C**, Vues zoomées de neuroblastes GABAergiques immuno-marqués pour dlx5 et cdhr23 ou cdhr15. **D**, Vue zoomée d'une cellule de la glie radiaire de la zone sous-ventriculaire externe immuno-marquée pour la nestine et adgrv1. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu (DAPI). Abréviations : dorsal (d) ; médial (m) ; latéral (l). Adapté de Libé-Philippot *et al.*, article accepté⁴¹².

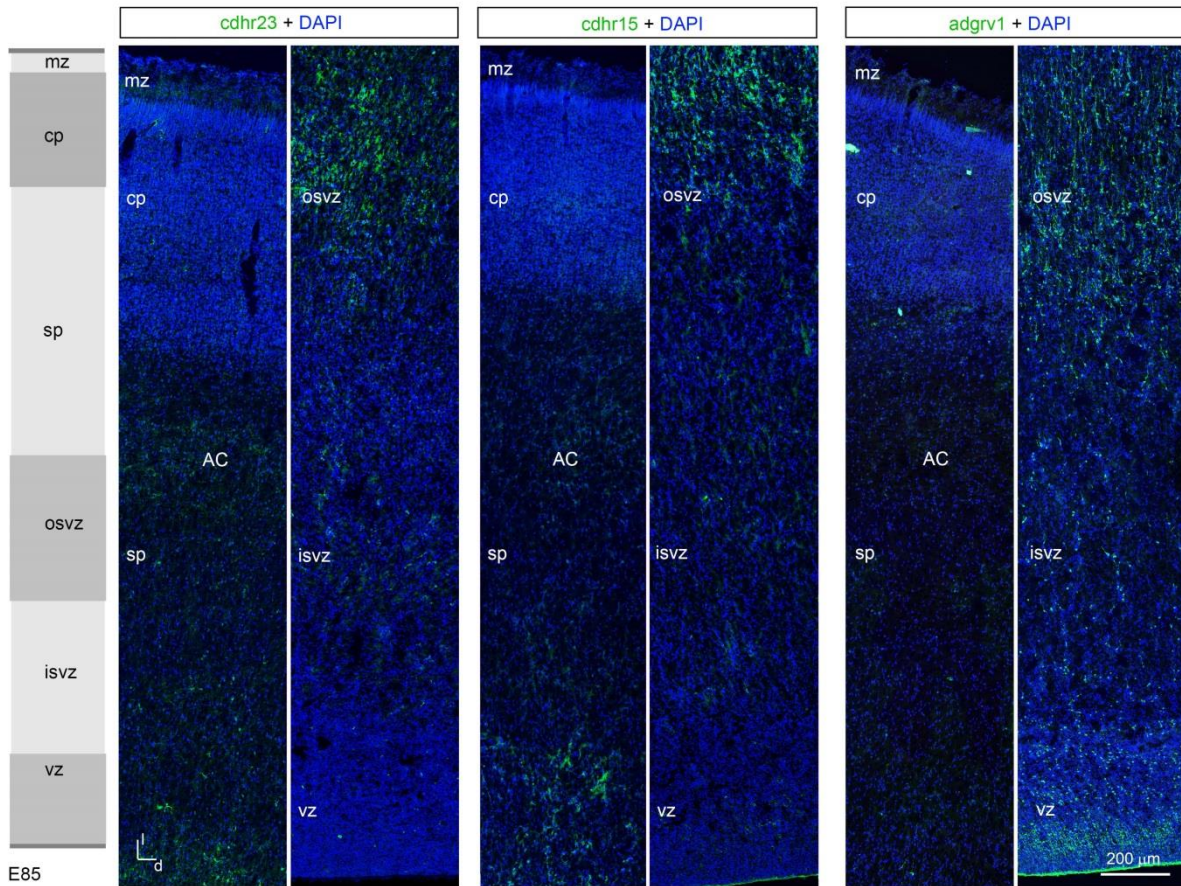


Figure 32 Profils d'expression de *cdhr23*, *cdhr15* *adgrv1* dans le cortex auditif du macaque. Schéma d'une tranche sagittale de cortex auditif (AC) de macaque à E85 et les tranches correspondantes immuno-marquées pour *cdhr23*, *cdhr15* ou *adgrv1*. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu (DAPI). Adapté de Libé-Philippot *et al.*, article révisé⁴¹².

Discussion et perspectives

I. **Cdhr23, cdhr15 et adgrv1 participent au développement des interneurons du cortex auditif : un exemple de « bricolage évolutif »**

Nous avons vu que *cdhr23*, *cdhr15* et *adgrv1* sont des protéines ancestrales : des orthologues pour *Cdhr23* et *Adgrv1* sont présents *a priori* dans les génomes de tous les eumétazoaires, pour *Cdhr15* *a priori* dans le génome de tous les bilatériens (**Introduction VC-D, Figure 16**).

Les orthologues de *cdhr23* forment des liens fibreux entre les microvillosités des cellules ciliées de l'anémone étoilée et dans celles de la ligne latérale chez le poisson zèbre⁴¹⁸ (**Figure 16**). L'orthologue de *cdhr15* chez la drosophile (*cad99c*) est localisée dans les microvillosités des cellules intestinales et des follicules ovariens⁴¹⁹. Chez le macaque et le xénope (*Xenopus laevis*), *cdhr23* et *cdhr15* participent à la formation des processus calycéaux dans les photorécepteurs, absents chez la souris. Ces structures sont apparentées à des microvillosités^{388,420}. **Cdhr23 et cdhr15 sont donc impliquées dans la fonctionnalité de microvillosités, et plus particulièrement dans la formation de liens fibreux entre elles.** En plus de ce rôle, *cad99c* contrôle l'expansion apicale et le réarrangement cellulaire pendant l'élongation du tube épithélial salivaire, **suggérant un rôle d'adhérence à proprement parlé pour cad99c**⁴²¹. En dehors des cellules ciliées auditives et de la ligne latérale, *Cdhr23* est exprimé chez le poisson zèbre dans les cellules GABAergiques amacrines de la rétine et le subpallium du télencéphale⁴¹⁸. *Cdhr15* a été rapporté comme étant exprimé chez la souris dans les zones ventriculaires cérébrales aux stades embryonnaires, ainsi que dans plusieurs organes comme l'épithélium olfactif, les reins, la langue, les vibrisses, les bronches et l'intestin⁴²².

A. Apparition de la migration tangentielle dans le télencéphale et de l'expression de *cdhr23* et *cdhr15* au cours de l'évolution

Si *cdhr23* et *cdhr15* sont des protéines ancestrales, existant chez des espèces sans néocortex, quand ont-elles pu être réutilisées dans la migration tangentielle des neuroblastes GABAergiques ?

La migration tangentielle de neuroblastes GABAergiques, du subpallium au néocortex, est conservée chez les mammifères. En ce qui concerne les autres vertébrés (sans néocortex, mais avec un pallium), 90% des neurones GABAergiques du pallium du poulet (*Gallus gallus*) proviennent du subpallium, et plus particulièrement 75% d'entre eux de l'aire analogue à la MGE (pallidum). Cependant, leurs flux de migration tangentielle ne sont pas clairement dessinés (les neuroblastes GABAergiques migrent tangentiellement sans se concentrer au sein de deux flux). Des résultats analogues sont obtenus chez le xénope et la tortue (*Emys orbicularis*), chez qui les neurones GABAergiques proviennent de la MGE, de la LGE et de la frontière entre le pallium et le subpallium, et chez la lamproie (*Petromyzon marinus*) chez qui la MGE est absente. Chez le requin (*Scyliorhinus canicula*), les flux de migration tangentielle sont bien dessinés⁴²³. **La migration tangentielle de neuroblastes GABAergiques, du subpallium au pallium, est donc conservée chez les vertébrés. En revanche, toutes les espèces n'ont pas forcément une MGE ou des flux de migration tangentielle bien dessinés (Figure 33).**

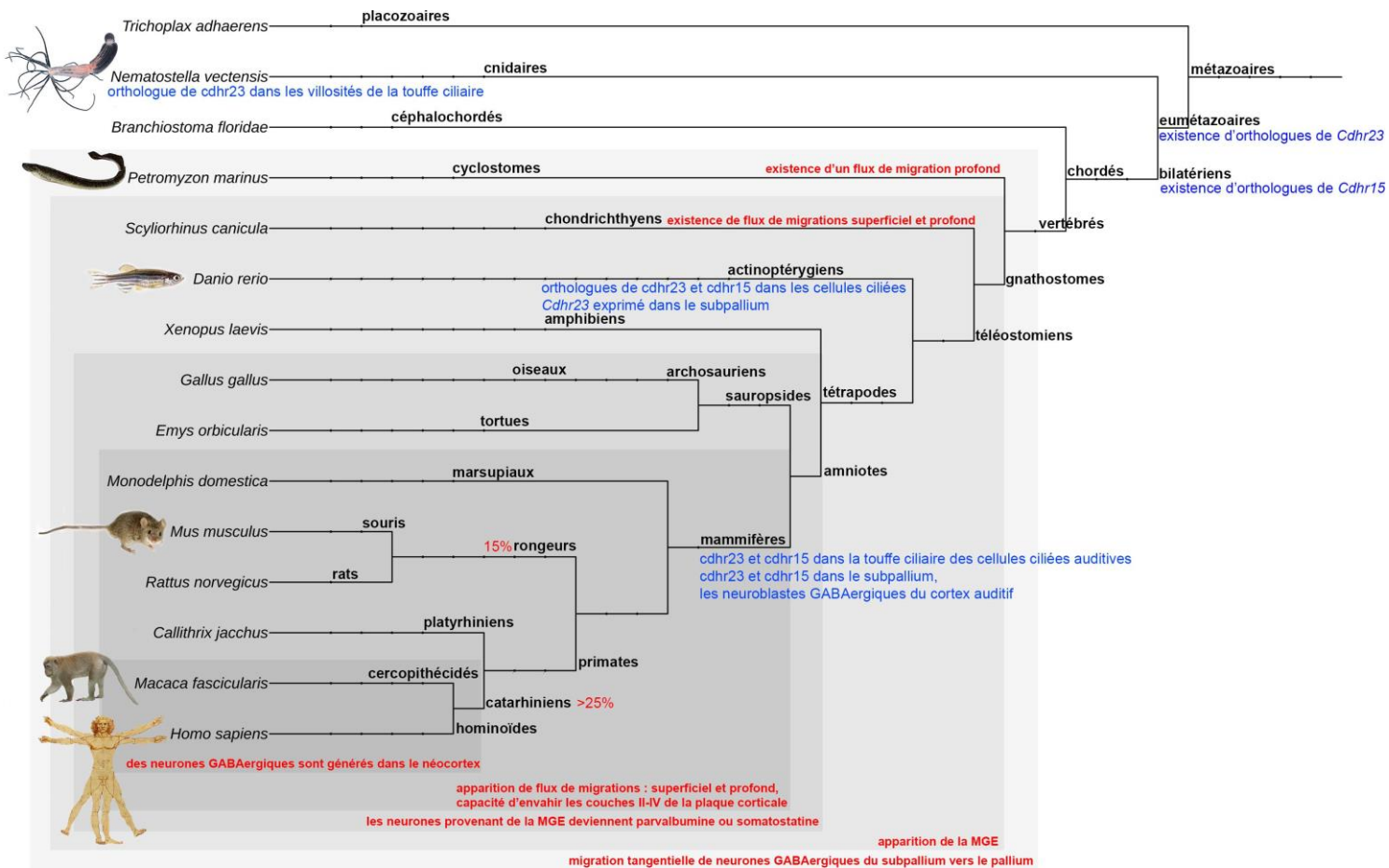
Afin d'étudier la capacité des neuroblastes GABAergiques à répondre aux signaux de l'environnement pendant leur migration, et surtout la conservation de ces signaux, des explants de subpallium d'espèces différentes ont été greffés dans des télencéphales murins. Il apparaît que les neuroblastes GABAergiques des amniotes peuvent migrer dans un télencéphale murin. En ce qui concerne des espèces plus éloignées (poulet, tortue), la migration tangentielle des neuroblastes greffés est possible mais pas leur entrée dans la plaque corticale. Cette entrée dans la plaque corticale est possible pour des neuroblastes

GABAergiques issus d'embryons de ouistiti (*Callitrix jacchus*)^{424,425}. **La migration tangentielle partage donc sans doute des mécanismes communs chez tous les vertébrés. Cependant, l'entrée dans la plaque corticale semble différente d'une espèce à une autre, en tout cas d'un genre à un autre (Figure 33).**

Nous avons vu que *cdhr23* et *cdhr15* sont exprimées dans des neuroblastes GABAergiques des ganglions de la base chez la souris. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse qu'elles sont exprimées dans le subpallium de tous les vertébrés puisqu'ils comportent tous des ganglions de la base. Un argument en faveur de cette hypothèse est l'expression de *Cdhr23* dans le subpallium du poisson zèbre⁴¹⁸. Cela pourrait ne pas être le cas chez la lamproie, et les cyclostomes plus généralement, à cause de l'absence de MGE. En ce qui concerne l'expression dans le flux de migration tangentielle, se pose la question de leur expression dans des neuroblastes GABAergiques à destination d'aires corticales non auditives. Par exemple, *cdhr23* et *cdhr15* sont exprimées dans les cellules ciliées de la ligne latérale chez le poisson zèbre : sont-elles aussi exprimées dans des régions corticales participant à la même fonction ? *Cdhr23* et *cdhr15* sont exprimées dans les photorécepteurs chez le macaque mais très peu voire pas chez la souris : sont-elles exprimées dans le cortex visuel chez le macaque ? *Cdhr23* et *cdhr15* sont exprimées chez les mammifères dans les cellules ciliées vestibulaires, en plus des cellules ciliées auditives³⁸⁴. Aucune aire corticale vestibulaire n'est connue chez les rongeurs à ce jour, alors que c'est le cas chez les primates⁴²⁶ : *cdhr23* et *cdhr15* sont-elles exprimées dans le cortex vestibulaire chez le macaque ? L'étude de l'expression de *cdhr23* et *cdhr15* dans ces espèces répondra à ces questions.

Se pose la question de l'intérêt évolutif de réutiliser ces deux protéines apparentées aux cadhérines dans le développement du cortex auditif. Toutes les régions auditives cérébrales pourraient exprimer des protéines d'adhérence qui leur seraient spécifiques, comme c'est le cas pour la contactine-5⁴²⁷. A ce moment-là, les neuroblastes GABAergiques pourraient, grâce à cdhr23 et cdhr15, faire des connexions synaptiques avec les neurones pyramidaux du cortex auditif et/ou les axones auditifs thalamo-corticaux. Revenons sur l'expression de cdhr23 et cdhr15 dans les ganglions de la base. Nous avons vu que les marquages pour cdhr23 et cdhr15 ne sont pas observés dans les régions antérieures du télencéphale. Cdhr23 et cdhr15 sont donc exprimées dans les régions médiales/postérieures selon l'axe antéro-postérieur des ganglions de la base, précisément là où projettent les axones provenant des couches corticales inférieures du cortex auditif⁴²⁸. **L'intérêt évolutif de la réutilisation de cdhr23 et cdhr15 dans le développement cortical participerait ainsi à la mise en place de réseaux neuronaux, de la même manière que les motoneurones qui expriment quatre cadhérines différentes (Introduction VA).**

On pourrait aussi imaginer que les interneurones aient des propriétés intrinsèques, par exemple électrophysiologiques, différentes d'un cortex à un autre. **La réutilisation de cdhr23 et cdhr15 dans le développement des interneurones du cortex auditif aurait alors un intérêt fonctionnel.** L'étude de la fonction de ces interneurones, et la généralisation de nos résultats à d'autres systèmes sensoriels vérifieraient cette hypothèse.



Elements conservés du développement des neurones GABAergiques ; X% (Proportion of GABAergic neurons in the néocortex)
 Expression et/ou rôle de cdhr23 et cdhr15

Figure 33 Conservation de la migration tangentielle dans le cortex des vertébrés et données sur l'expression de cdhr23 et cdhr15. Arbre phylogénétique généré par phyloT. En rouge, les différentes caractéristiques de la migration tangentielle des neuroblastes GABAergiques du subpallium vers le pallium et de la naissance d'interneurones dans le néocortex. Les pourcentages en rouge indiquent la proportion d'interneurones dans le cortex cérébral. En bleu, l'apparition des gènes orthologues de *Cdhr23* et *Cdhr15* ainsi que l'expression de *cdhr23* et *cdhr15* dans les cellules ciliées et le subpallium. Données issues de Tanaka & Nakajima, 2012⁴³ ; Glover *et al.*, 2012⁴¹⁸ ; Hulpiau *et al.*, 2009³⁶² et Hulpiau *et al.*, 2016³⁶⁵.

B. Rôles de cdhr23, cdhr15 et adgrv1 dans le développement des interneurones chez la souris

Cdhr23 et *cdhr15* sont synthétisées dans les neuroblastes GABAergiques dès leur stade postmitotique dans la MGE, stade où ils commencent à montrer un phénotype migratoire. *In vitro*, *cdhr23* et *cdhr15* sont localisées autour du noyau (à l'endroit de la cage microtubulaire périnucléaire, où il y a également de l'actine), le long du processus conducteur (principalement formé par le cytosquelette de tubuline) et dans le lamellipode (principalement formé de cytosquelette d'actine). Ces marquages sont réalisés contre des épitopes des parties extracellulaires de *cdhr23* et *cdhr15* et sont observés sans

perméabilisation : *cdhr23* et *cdhr15* sont donc localisées à la membrane. A l'échelle subcellulaire, les marquages pour ces deux protéines sont partiellement colocalisés. De plus, l'absence de l'une de ces protéines n'entraîne pas la délocalisation de l'autre. Les neuroblastes issus d'embryons homozygotes mutants pour *Cdhr23* et *Cdhr15* présentent des défauts de polarité cellulaire : une localisation aléatoire du centrosome autour du noyau en l'absence de *cdhr15* (*cdhr23* restant synthétisée et sans anomalie de localisation) et une multipolarité en l'absence de *cdhr23* (*cdhr15* restant synthétisée et sans anomalie de localisation). Ces résultats suggèrent une absence d'interaction directe et des rôles cellulaires indépendants pour *cdhr23* et *cdhr15*, pendant la migration tangentielle.

Etant donné que la position du centrosome et l'élaboration du processus conducteur sont dépendantes du cytosquelette de tubuline, une interaction de *cdhr15* et *cdhr23* avec le cytosquelette de tubuline est possible. *Cdhr23* pourrait le faire via *camsap3* et *cdhr15* probablement via une voie différente. Dans les cellules ciliées du poulet, *cdhr23* et *cdhr15* participent à la formation de liens transitoires entre le kinocilium (formé de tubuline) et les stéréocils. Ces liens sont polarisés : *cdhr23* est du côté des stéréocils et *cdhr15* du côté du kinocilium⁴²⁹. Il est donc possible que des interactants communs existent entre *cdhr15* et le cytosquelette de tubuline dans les cellules ciliées et les neuroblastes GABAergiques. Dans les cellules ciliées, ces deux protéines apparentées aux cadhérines sont surtout connues comme interagissant avec le cytosquelette d'actine³⁹⁰. Il n'est donc pas impossible, vue leur localisation au lamellipode, que ce soit aussi le cas dans les neuroblastes GABAergiques.

Cdhr15 interagit avec le complexe de transduction mécano-électrique dans les cellules ciliées. Or, il existe une telle transduction dans les neuroblastes en migration³⁰⁹. Il se pourrait donc que *cdhr15* participe à cette transduction, éventuellement avec des canaux présents dans les cellules ciliées. En ce qui concerne le rôle extracellulaire de ces protéines, on peut envisager qu'elles participent pendant la migration tangentielle à l'adhérence au substrat cellulaire (axones thalamo-corticaux, cortico-thalamiques, glie radiaire, neurones), via une

interaction hétérophilique, ou à des contacts transitoires que les neuroblastes pourraient établir entre eux via une interaction homophile. L'exploration de ce rôle pourrait permettre d'étudier l'implication de l'adhérence dans la migration tangentielle et éventuellement de l'interaction entre les neuroblastes et les différentes structures anatomiques du substrat, point qui a été peu étudié jusqu'à aujourd'hui. Etant donné que les neuroblastes présentent des défauts migratoires *in vitro*, on peut exclure comme défaut primaire une absence de détection des signaux de l'environnement. On peut en revanche imaginer un défaut secondaire analogue à celui observé en l'absence de NCAM1 (**Introduction Partie IID**) : la localisation subcellulaire des différents récepteurs impliqués dans la migration tangentielle pourra être étudiée dans les neuroblastes issus de MGE d'embryons pour lesquels *Cdhr23* ou *Cdhr15* ont été inactivés. La localisation ectopique, dans des régions normalement non permissives à la migration des neuroblastes GABAergiques (**Introduction IIC**), des immunomarquages pour *cdhr23* et *cdhr15* en l'absence de *cdhr15* et *cdhr23*, respectivement, suggère en effet un défaut de détection des signaux de l'environnement.

Nous avons vu que *cdhr23* et *cdhr15* n'ont pas été décrites spécifiquement dans des processus d'adhérence cellulaire (excepté *cad99c* chez la drosophile) mais dans la formation de liens fibreux. Si *cdhr23* et *cdhr15* participent à de tels mécanismes d'adhérence, ces mécanismes pourraient permettre d'étudier de nouveaux types d'interactions moléculaires pour ces protéines apparentées aux cadhérines. Nous avons en effet vu qu'elles interagissent entre elles de manière atypique (en « serrage de main »). Mais si elles forment des interactions hétérophiliques avec d'autres cadhérines, elles pourraient interagir avec ces dernières de manière conventionnelle. On peut *a priori* exclure une interaction hétérophilique *en cis* entre elles, puisque l'absence de l'une de ces protéines n'entraîne pas une délocalisation de l'autre et leur absence d'expression n'induit pas les mêmes anomalies de polarité cellulaire.

En plus d'une implication dans la migration tangentielle, cdhr15 participe à la survie des interneurones immatures aux stades postnatals précoces, et probablement cdhr23 aussi (qui disparaît lorsque cdhr15 disparaît). Or, nous avons vu que les interneurones immatures sont en pleine synaptogenèse à ce moment-là. Il n'est donc pas impossible que cdhr15 et cdhr23 participent à la synaptogenèse des interneurones du cortex auditif, là encore avec des interactants à définir. Ce ne serait pas le premier exemple de protéines impliquées dans la migration tangentielle et la synaptogenèse : cdh2, adgrc3, les récepteurs aux neurotransmetteurs, participent à ces deux étapes de développement (**Introduction Partie IIC, IID**).

En conclusion, cdhr23 et cdhr15 interagissent probablement avec le cytosquelette de tubuline dans les neuroblastes GABAergiques (cdhr23 avec celui lié au centrosome, cdhr15 avec celui du processus conducteur), possiblement avec celui d'actine dans le lamellipode. On peut imaginer en plus un rôle d'adhérence cellulaire lors de la migration qui reste à être confirmé et à être exploré (notamment trouver des interactants) et/ou de transduction mécano-électrique. Cdhr15, et possiblement cdhr23, participent à la survie des interneurones immatures dans le cortex auditif, possiblement en participant à la synaptogenèse.

Mes résultats indiquent qu'adgrv1 participe à la migration des neuroblastes GABAergiques qui expriment cdhr23 et cdhr15. Son expression est complexe. Adgrv1 est exprimé dans les progéniteurs du subpallium, de manière large dans le télencéphale pendant la migration tangentielle (je n'ai pas pu identifier les types cellulaires qui l'expriment, mais adgrv1 est peu exprimé dans les neuroblastes GABAergiques issus de la MGE), et dans la glie radiaire du cortex auditif à E18,5. Etant donné que les immuno-marquages étaient réalisés contre sa partie extracellulaire et qu'il est possible qu'il existe des isoformes extracellulaires, il faudra utiliser des anticorps dirigés contre la partie cytoplasmique d'adgrv1 ainsi que des embryons rapporteurs afin d'identifier tous les types cellulaires qui expriment

Adgrv1. Quoiqu'il en soit, *cdhr23* et *cdhr15* sont exprimées en l'absence d'*adgrv1*, ce qui suggère que l'absence d'expression d'*Adgrv1* dans les progéniteurs n'empêche pas la formation de neuroblastes GABAergiques exprimant *cdhr23* et *cdhr15*. Je ne détecte pas d'immuno-marquage pour *cdhr23* et *cdhr15* dans le néocortex en l'absence d'*adgrv1*, et je mesure une diminution du nombre d'interneurones à parvalbumine dans le cortex auditif. Cela suggère une intervention, de manière « cellule non-autonome » d'*adgrv1* dans la migration des neuroblastes GABAergiques exprimant *cdhr23* et *cdhr15* (les neuroblastes GABAergiques issus d'embryons *Adgrv1*^{-/-} ne présentent pas de défauts de migration *in vitro*). Des greffes d'explants de MGE « sauvages » dans des tranches télencéphaliques n'exprimant pas *adgrv1* présentent en effet une surface de migration réduite uniquement pour les neuroblastes exprimant *cdhr23*. **Je propose donc une interaction, directe ou indirecte, entre *adgrv1*, localisé dans le substrat de migration, et les neuroblastes exprimant *cdhr23* et *cdhr15*, selon un mécanisme à préciser.**

C. Perspectives

J'ai étudié l'expression de *cdhr23* et *cdhr15* par immuno-marquage contre des épitopes extracellulaires (pour *cdhr23*, EC1, et pour *cdhr15*, en fonction de l'anticorps utilisé la région extracellulaire proche du domaine transmembranaire ou une région allant de EC7 à EC10). L'intérêt de cette technique est d'avoir étudié des protéines synthétisées ainsi que leur localisation subcellulaire. Cependant, on peut imaginer que d'autres isoformes, non détectées, soient synthétisées au cours du développement du télencéphale. Elles pourraient participer au développement d'autres types cellulaires et pourraient interagir *en trans* avec les isoformes portées par les neuroblastes GABAergiques. De plus, il est possible que les épitopes visés ne soient pas détectés avant E13,5 ou après P7 parce qu'ils ne sont pas accessibles. Quoiqu'il en soit, les expériences d'inactivation conditionnelle de l'expression de *Cdhr23* et *Cdhr15* indiquent que les phénotypes pathologiques étudiés (perte des

interneurones à parvalbumine dans le cortex auditif et manifestation des crises audiogènes) sont bien dus à l'absence d'expression de ces gènes dans les précurseurs d'interneurones issus de la MGE.

Il faudra développer de nouveaux outils génétiques chez la souris, par exemple l'expression d'un rapporteur éventuellement inductible dans les cellules qui ont exprimé ou qui expriment *Cdhr23* ou *Cdhr15*, afin d'identifier d'éventuels autres types cellulaires exprimant *Cdhr23* et *Cdhr15* ou une potentielle expression avant E12,5 et après P7. L'expression du rapporteur devra laisser intacte l'expression des deux allèles. Ces outils génétiques permettront aussi de suivre en direct les neuroblastes exprimant *Cdhr23* ou *Cdhr15*. Cela permettra de préciser le rôle de *cdhr23* et *cdhr15* dans la dynamique migratoire. Le rôle possible de *cdhr23* et *cdhr15* dans la synaptogenèse, en tout cas dans l'apoptose, pourra aussi être exploré. J'ai réalisé mes expériences dans le télencéphale. Ces outils proposés permettront d'établir si d'autres régions auditives, ou non auditives, sous-corticales, expriment ces gènes (c'est le cas pour *adgrv1* dans le colliculus inférieur⁶). De plus, se pose la question de la possible généralisation de ces conclusions à d'autres protéines considérées comme étant spécifiques des cellules sensorielles auditives (comme *tbc1d24* ou l'otoferline⁷⁻⁹) et à d'autres systèmes sensoriels.

En ce qui concerne le rôle d'*adgrv1*, des animaux exprimant un rapporteur sous le contrôle du promoteur d'*Adgrv1* permettront de préciser les types cellulaires qui l'expriment. De plus, l'interaction directe ou indirecte entre *adgrv1* et *cdhr23* et/ou *cdhr15* devra être abordée (aucune donnée dans les cellules ciliées ne permet d'émettre une quelconque hypothèse).

Pour répondre aux questions évolutives, il pourra être intéressant d'étudier l'expression de *Cdhr23* et *Cdhr15* chez d'autres espèces, afin de déterminer quand elles ont été réutilisées dans le télencéphale, ainsi que les régions cérébrales qui les expriment.

II. Défauts intrinsèques dans le cortex auditif en l'absence d'expression de protéines considérées comme étant spécifiques des cellules sensorielles auditives

Mes résultats montrent une diminution de la proportion d'interneurones à parvalbumine, mais pas des interneurones à somatostatine, dans le cortex auditif de souris *Cdhr23*^{+/-}, *Cdhr23*^{-/-}, *Cdhr15*^{+/av-3J}, *Cdhr15*^{av-3J/av-3J} et *Adgrv1*^{-/-} associée à une disposition aux crises audiogènes chez les animaux *Cdhr23*^{+/-}, *Cdhr15*^{+/av-3J} et *Adgrv1*^{-/-}. Ces deux phénotypes, anatomique et comportemental, sont indépendants d'un quelconque défaut auditif périphérique. En effet, les animaux *Cdhr15*^{+/av-3J} et *Cdhr23*^{+/-} n'ont pas de défaut d'audition périphérique mesuré par PEAs et OEAs des produits de distortion. De plus, la manifestation des crises audiogènes est corrélée à la diminution de la proportion d'interneurones à parvalbumine dans le cortex auditif de ces souris. L'invalidation conditionnelle de *Cdhr23* et *Cdhr15* dans les cellules exprimant *Nkx2.1* (dans les progéniteurs de la MGE et non dans la cochlée) ou de *Cdhr15* dans le cortex auditif uniquement à P1 est suffisante pour induire ces deux phénotypes. J'observe un défaut du développement de neuroblastes GABAergiques chez les embryons *Cdhr23*^{-/-}, *Cdhr15*^{-/-} et *Adgrv1*^{-/-} dès E14,5 (qui expriment *cdhr23* et/ou *cdhr15*, donc *a priori* ceux destinés au cortex auditif), soit avant la connection du cortex auditif avec les régions auditives sous-corticales (les axones thalamo-corticaux envahissent la plaque corticale vers E18,5) (**Figure 34**). Mes résultats révèlent un défaut intrinsèque, indépendant des régions sous-corticales auditives et donc de la cochlée, dans le cortex auditif des souris portant des mutations pour *Cdhr23*, *Cdhr15* (à l'état homozygote ou hétérozygote) et *Adgrv1*^{-/-}.

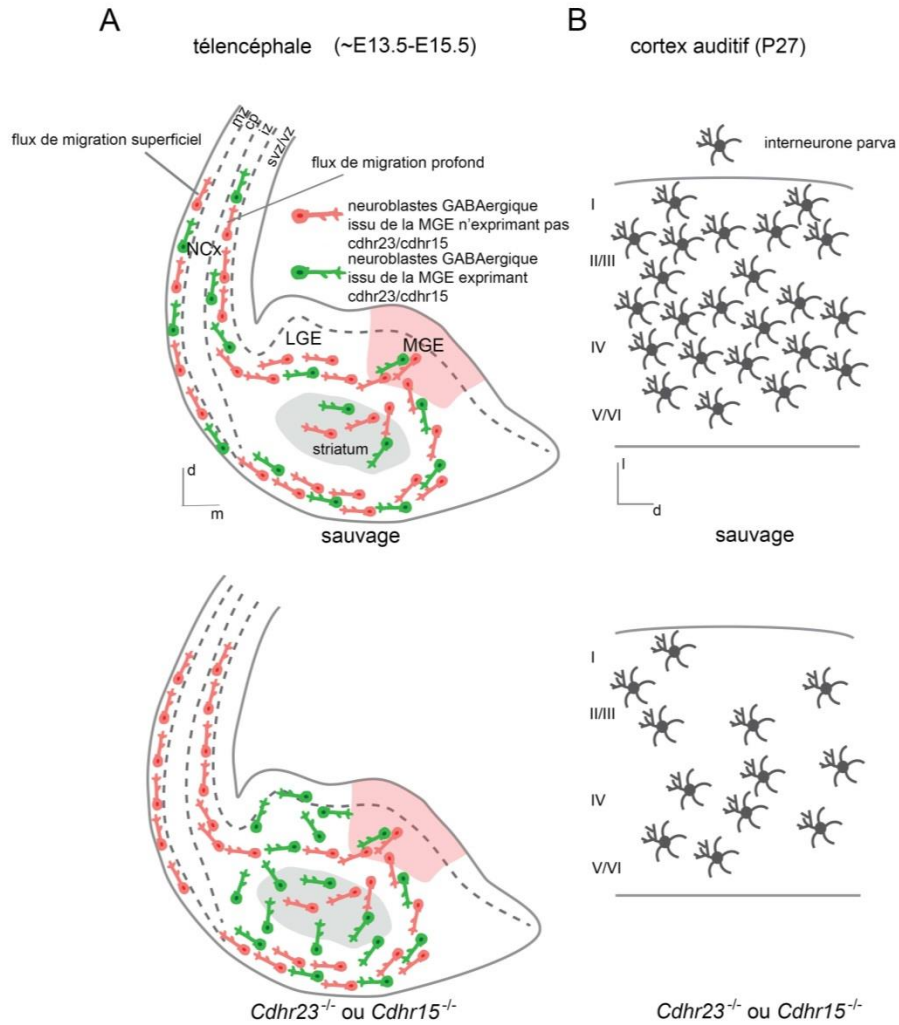


Figure 34 Les neuroblastes GABAergiques du cortex auditif utilisent *cdhr23* et *cdhr15* pour entrer dans le néocortex. **A**, schémas illustrant les défauts de migration observés chez les embryons mutants homozygotes pour *Cdhr23* et *Cdhr15* à E14,5 (absence de marquage pour *cdhr15* ou *cdhr23* dans le néocortex alors que les flux de migration tangentielle sont conservés). **B**, schémas illustrant la diminution du nombre d'interneurones à parvalbumine dans le cortex auditif à P27 chez les souris mutantes homozygotes pour *Cdhr23* et *Cdhr15*. Abréviations : néocortex (**NCx**), dorsal (**d**), médial (**m**), latéral (**l**). Adapté de Libé-Philippot *et al.*, article accepté⁴¹².

A. Absence d'interneurones à parvalbumine corticaux et disposition aux crises audiogènes chez la souris

Mes résultats apportent le premier exemple d'une diminution du nombre d'interneurones à parvalbumine restreinte à une aire corticale. La diminution du nombre d'interneurones à parvalbumine chez les souris *Cdhr23*^{+/-}, *Cdhr23*^{-/-}, *Cdhr15*^{+/av-3J}, *Cdhr15*^{av-3J/av-3J} et *Adgrv1*^{-/-} par rapport aux animaux sauvages est d'un facteur compris entre 2 et 4. Cette diminution est comparable aux diminutions décrites dans l'introduction pour des animaux mutants dans lesquels la migration tangentielle et/ou radiaire est altérée. Dans ces exemples, les neuroblastes GABAergiques s'accumulent dans le subpallium ou dans les zones sous la plaque corticale (**Introduction IA, II**).

La diminution du nombre d'interneurones à parvalbumine dans le cortex auditif de tous les animaux *Cdhr23*^{+/-} et *Cdhr15*^{+/av-3J} est intrigante. De plus, la variabilité inter-individuelle de cette diminution et de la manifestation des crises audiogènes posent également question. Des explications à l'échelle génétique ou épigénétique pourraient être envisagées, comme une **expression monoallélique aléatoire**⁴³⁰ ou l'**empreinte parentale**⁴³¹ (éventuellement uniquement dans l'encéphale embryonnaire ou des régions télencéphalique dont la MGE), à l'échelle cellulaire par une diminution de la quantité de protéine synthétisée, à l'échelle cérébrale par des mécanismes de compensation, ou à l'échelle de l'individu par la nature de son sexe. Ces mécanismes n'auraient pas lieu dans la cochlée. J'ai testé la première hypothèse en mesurant la proportions d'animaux manifestant des crises audiogènes chez des animaux dont la mutation venait du parent mâle, d'une part, et du parent femelle, d'autre part. Ces deux populations ont manifesté des crises audiogènes dans des proportions similaires, excluant *a priori* cette hypothèse. J'ai de la même manière invalidé l'hypothèse de l'intervention du sexe des individus. Il est possible que *Cdhr23* et *Cdhr15* s'expriment de manière monoallélique aléatoire. En effet, il a été montré *in vitro* dans des cellules issues de cellules souches embryonnaires que ces gènes peuvent avoir une expression monoallélique

sans préférence pour un allèle⁴³⁰. En fonction du stade cellulaire auquel ce mécanisme interviendrait (progéniteur apical, basal ou neuroblaste), on peut envisager qu'une partie des neuroblastes GABAergiques exprime l'allèle sain et une autre partie l'allèle muté, conduisant à une variabilité du nombre de neuroblastes entrant dans le néocortex.

Le fait que tous les animaux mutants doubles hétérozygotes *Cdhr23*^{+/-}/*Cdhr15*^{+/av-3J} manifestent des crises audiogènes ne permet pas conclure car ces animaux ont un défaut auditif périphérique¹⁵¹ qui pourrait avoir causé lui-même la disposition aux crises audiogènes. Notons que l'étude des animaux mutants doubles homozygotes *Cdhr23*^{-/-}/*Cdhr15*^{av-3J/av-3J} serait difficile. En effet, ces deux gènes sont distants sur le chromosome 10 de la souris de 1,3 millions de paires de bases (1,7 chez l'humain), ce qui implique une probabilité faible d'une recombinaison homologue permettant d'avoir les deux modifications sur le même chromosome.

L'absence de manifestation des crises audiogènes après P35 chez tous les animaux qui y sont prédisposés (*Adgrv1*^{-/-}, *Cdhr23*^{+/-} et *Cdhr15*^{+/av-3J}) indique l'existence de mécanismes de compensation. Ces mécanismes pourraient avoir lieu à l'échelle du réseau neuronal (neurones pyramidaux qui deviennent moins excitables, interneurons à somatostatine ou à 5HT3R_A qui augmenteraient leur fonction d'inhibition), corticale ou sous-corticales (régions corticales avoisinantes qui renforceraient leur inhibition, notamment les régions motrices probablement impliquées dans la manifestation des crises audiogènes, ou auditives sous-corticales). Si de tels mécanismes sont impliqués, ils pourraient expliquer la variabilité inter-individus. De plus, l'absence de manifestation des crises audiogènes n'implique pas l'absence de défaut fonctionnel du cortex auditif. Il est en effet tout à fait possible que tous les animaux *Cdhr23*^{+/-} et *Cdhr15*^{+/av-3J} présentent un défaut fonctionnel du cortex auditif, à tout âge, et que la compensation d'autres régions cérébrales empêche parfois la manifestation des crises audiogènes. De même, il est possible que les animaux *Cdhr23*^{-/-} et *Cdhr15*^{av-3J/av-3J} présentent un défaut fonctionnel du cortex auditif qui ne peut pas être testé par stimulations sonores. Des mesures des propriétés électrophysiologiques du

corte auditif et d'autres régions cérébrales des animaux $Cdhr23^{+/-}$, $Cdhr23^{-/-}$, $Cdhr15^{+/av-3J}$, $Cdhr15^{av-3J/av-3J}$ et $Adgrv1^{-/-}$ permettra de répondre à ces questions.

En ce qui concerne les crises audiogènes, elles ont été pour la plupart considérées comme étant générées dans le colliculus inférieur, et non dans le cortex auditif. Une diminution de l'inhibition dans le colliculus inférieur est en effet suffisante pour induire une manifestation des crises audiogènes^{432,433}. Rares sont les études ayant porté sur une possible implication du cortex auditif dans les crises audiogènes⁴³⁴. Mes résultats, notamment d'invalidation *in situ* de $Cdhr15$, illustrent le fait qu'un défaut d'inhibition dans le cortex auditif suffit à induire une disposition aux crises audiogènes.

Des animaux sauvages chez qui une surdité modérée ou sévère a été induite (bouchons dans les oreilles ou rupture de la membrane tympanique) sont disposés aux crises audiogènes⁴³⁵. Il en est de même si ces animaux sont dans un environnement très bruite⁴³⁶. Ces animaux sont préconditionnés aux crises audiogènes (en anglais, *primed*). Il existe en plus des modèles génétiques de prédisposition aux crises audiogènes (**Tableau 1**)⁴³⁷. Je rajoute à cette liste les souris $Cdhr23^{+/-}$, $Cdhr15^{+/av-3J}$, *stéréociline*^{-/-} et *otogéline*^{-/-}. Ces modèles génétiques sont de deux types. Le premier type regroupe les modèles avec une surdité modérée à sévère et une manifestation des crises audiogènes qui survient entre P20 et P35. Ces animaux peuvent être prédisposés pour les mêmes raisons que ceux qui sont préconditionnés. Ce premier groupe comprend la plupart des modèles génétiques de crises audiogènes. Le second regroupe des animaux chez qui l'audition n'a pas été testée mais dont la manifestation des crises audiogènes est tardive.

Tableau 1 Modèles génétiques de crises audiogènes. Les différents modèles génétiques de crises audiogènes qui se caractérisent par le stade développemental où les crises se manifestent (vers P30 chez la souris, indiqué « stade précoce », ou vers quelques mois, indiqué « stade tardif ») ainsi que la présence ou non de défauts auditifs périphériques. La plupart de ces modèles sont à stade précoce, avec un défaut périphérique.

Espèce	Nom de la lignée	Gène(s) muté(s)	Caractéristiques des crises	Audition périphérique/ sous-corticale	Références
Rat		<i>Lgi1</i>	Crises spontanées, plus forte disposition aux crises audiogènes chez les animaux préconditionnés, stades précoces	Inconnue, animaux préconditionnés	Baulac <i>et al.</i> , 2012 ⁴³⁸
	Krushinsky – Molodkina	Inconnu	Manifestation des crises à 2-3 mois	Inconnue, animaux préconditionnés	Poletaeva <i>et al.</i> , 2015 ⁴³⁹
	GEPR (3 ou 9)	Inconnu	Manifestation des crises à 3 mois	Défauts morphologiques des cellules sensorielles	Penny <i>et al.</i> , 1983 ⁴⁴⁰ ; Fainglod <i>et al.</i> , 1990 ⁴⁴¹
	P77PMC	Inconnu	Réflexes thermiques et audiogènes, préconditionnement par injection de kainate	Inconnue	Zhao <i>et al.</i> , 1985 ⁴⁴²
	WAR	Inconnu	Manifestation des crises à 2 mois	Inconnue	Doretto <i>et al.</i> , 2003 ⁴⁴³
Souris		<i>contactine-5</i>	Manifestation moindre que les contrôles mais plus grande mortalité, stade précoce	Inconnue (le gène est exprimé tout le long des voies auditives centrales)	Li <i>et al.</i> , 2003 ⁴⁴⁴
		<i>Fyn proto-oncogene</i>	Disposition plus importante chez les animaux préconditionnés, stade précoce	Inconnue	Miyakawa <i>et al.</i> , 1995 ⁴⁴⁵
		<i>tyrosine hydroxylase</i>	Manifestation des crises aux stades précoces	Défauts d'audition périphérique	Saunders <i>et al.</i> , 1972 ⁴⁴⁶
	DBA1, DBA2	Inconnu	Manifestation des crises aux stades précoces et tardifs	Défauts d'audition périphérique	Lints <i>et al.</i> , 1980 ⁴⁴⁷ ; Schreiber <i>et al.</i> , 1980 ⁴⁴⁸ ; Faingold <i>et al.</i> , 2010 ⁴⁴⁹
	Frings	<i>Adgrv1</i>	Manifestation des crises aux stades précoces	Défauts d'audition périphérique, seuils PEAs plus élevés, modèle d'USH2	Skradski <i>et al.</i> , 1998 ⁴¹⁰ ; Yagi <i>et al.</i> , 2005 ⁴¹¹ et Yagi <i>et al.</i> , 2009 ⁴⁰⁶
		<i>Gipc3</i>	Manifestation des crises aux stades précoces	Défauts d'audition périphérique, seuils PEAs plus bas	Charizopoulou <i>et al.</i> , 2011 ⁴⁵⁰
		<i>RB transcriptional corepressor-1 et -2</i>	Manifestation des crises aux stades précoces	Défauts d'audition périphérique, défauts de prolifération cellulaire dans la cochlée	Schreiber <i>et al.</i> , 1980 ⁴⁴⁸ ; Rocha-Sanchez <i>et al.</i> , 2011 ⁴⁵¹
		<i>tectorine-α</i>	Manifestation des crises à stade précoce	Défauts d'audition périphérique, seuils PEAs plus élevés	Legan <i>et al.</i> , 2014 ⁴⁵²
		<i>thrombospondine-2</i>	Manifestation des crises à stade précoce	Défauts d'audition périphérique	Mendus <i>et al.</i> , 2014 ⁴⁵³
		<i>thyroid hormone receptor beta</i>	Manifestation des crises à stade précoce	Défauts d'audition périphérique	Ng <i>et al.</i> , 2001 ⁴⁵⁴ ; Dettling <i>et al.</i> , 2014 ⁴⁵⁵

		<i>Cdhr23</i>	Manifestation des crises à stade précoce	Absence de défauts d'audition périphérique	Libé-Philippot <i>et al.</i> , article accepté ⁴¹²
		<i>Cdhr15</i>	Manifestation des crises à stade précoce	Absence de défauts d'audition périphérique	Libé-Philippot <i>et al.</i> , article accepté ⁴¹²
		<i>otogeline</i>	Manifestation des crises à stade précoce	Défauts d'audition périphérique, seuils PEAs plus élevés	Donnée non publiée
		<i>stéréociline</i>	Manifestation des crises à stade précoce	Défauts d'audition périphérique, seuils PEAs plus élevés	Donnée non publiée
		<i>Fmr1</i>	Manifestation des crises à P70	Inconnue, exprimé dans le tronc cérébral auditif	Chen <i>et al.</i> , 2001 ⁴⁵⁶
		<i>selenocysteine lyase ; selenoprotein P1</i>	Manifestation des crises à P80	Inconnue	Byrns <i>et al.</i> , 2014 ⁴⁵⁷
		<i>Htr2c</i>	Manifestation des crises à P75	normale à P15	Brennan <i>et al.</i> , 1997 ⁴⁵⁸
Hamster	GASH-Sal	Inconnu	Manifestation des crises à stade tardif	Défauts d'audition périphérique, seuils PEAs plus élevés	Carballosa-Gonzalez <i>et al.</i> , 2013 ⁴⁵⁹ ; Sánchez-Benito <i>et al.</i> , 2016 ⁴⁶⁰
Lapin	Beverens	Inconnu	Inconnu	Inconnu	Nellhaus, 1958 ⁴⁶¹
Poulet	Fayoumi	<i>synaptic vesicle glycoprotein 2A</i>	Crises réflexes visuelles et auditives	Inconnu	Nunoya <i>et al.</i> , 1983 ⁴⁶² ; Fadlallah, 1997 ⁴⁶³

Il n'y a pas d'exemple de modèle animal sans surdité périphérique avec une prédisposition précoce aux crises audiogènes, exception faite des animaux que je décris dans ce manuscrit. Il faudra donc reprendre tous ces modèles, invalider les gènes concernés uniquement dans l'encéphale (s'ils y sont exprimés) et tester leur disposition aux crises audiogènes. On peut s'attendre à ce que certains ne soient pas disposés aux crises audiogènes (la disposition n'est alors que la conséquence indirecte du défaut d'audition périphérique) et que d'autres le soient (révélant un rôle du gène concerné dans l'encéphale). Les crises audiogènes sont un phénomène paroxystique induit par un son de forte intensité. Ainsi, leur absence ne signifie pas nécessairement absence de défaut fonctionnel du cortex auditif. Il faudra donc également étudier le fonctionnement à l'état basal du cortex auditif.

B. Rôles des interneurones à parvalbumine et à somatostatine dans le cortex auditif

Les précurseurs d'interneurones à parvalbumine qui synthétisent *cdhr23* et *cdhr15* sont adressés au cortex auditif. Quel rôle jouent les interneurones à parvalbumine dans le cortex auditif ? Avant de répondre à cette question, nous pouvons nous demander à quelles fonctions participe le cortex auditif.

Notre environnement fourmille de bruits. On considère certains de ces bruits comme non informatifs : par exemple, le bruit de la ventilation dans une pièce, du moteur dans une voiture, ou encore le bruit ambiant lors d'une soirée. Parmi ces bruits considérés comme non informatifs, le système auditif central extrait des sons qui portent une information jugée pertinente : par exemple, le discours de la personne que nous écoutons, ou pour un animal sauvage, les sons émis par ses congénères et ceux des autres espèces occupant la même niche écologique. Chez l'humain, l'audition se met en place à partir de GW19 : le fœtus bouge en réponse à des sons envoyés contre le ventre de la mère. A GW19, il répond à des sons de basse fréquence (500 Hz) puis répond vers GW35 à des sons de fréquence plus élevée (3 kHz)⁴⁶⁴. L'oreille mature, chez l'humain, peut détecter des sons allant de 20 Hz (note la plus grave d'un piano ou d'une guitare basse) à 20 kHz (harmonique le plus élevé de nombreux instruments, dont les cymbales ou le violon). Chez la souris, ce spectre fréquentiel est décalé dans les aigus, de 2 kHz (harmonique le plus aigu d'un tuba) à 91 kHz (ultrasons). Dans un environnement naturel, le niveau (ou intensité) sonore va de 0 dB SPL (zone désertique) à 130 dB SPL (coup de tonnerre). **La représentation spectrale des fréquences (tonotopie)** est un principe organisateur de la la cochlée et de la plupart des régions du système auditif central, dont le cortex auditif. L'audition ne peut se résumer à la simple discrimination fréquentielle, qui est opérée dès l'organe auditif périphérique, la cochlée. Elle requiert aussi la détection **des interruptions dans un signal sonore** (en anglais, *gap*, mature chez l'humain à environ 4 ans), **la localisation de la source sonore** (mature chez

l'humain à environ 5 ans), **la discrimination en intensité et en durée** (mature chez l'humain à 18 ans), **la détection de la modulation d'amplitude** (mature chez l'humain à environ 17 ans) et **l'apprentissage perceptuel** (mature chez l'humain à 27 ans)⁴⁶⁵. Le système auditif doit également pouvoir détecter **la hauteur tonale** (en anglais, *pitch*). Cette détection est importante dans les langues tonales comme le chinois, le vietnamien ou le thaï. **Le cortex auditif est nécessaire (mais non suffisant) à la plupart de ces fonctions. De plus, il mature après la naissance (contrairement aux régions auditives sous-corticales), tout comme ces fonctions. Plus particulièrement, les interneurones corticaux interviennent dans ces fonctions**^{466,467}.

Le rôle des interneurones du cortex auditif a surtout été étudié chez les rongeurs. Une étude a évalué la proportion de chaque type d'interneurones dans le cortex auditif du rat⁸⁹. Les auteurs ont observé que le nombre d'interneurones à parvalbumine est stable à partir de 20 jours après la naissance mais pas des interneurones à somatostatine qui atteignent leur nombre final 120 jours après la naissance, ni des interneurones à VIP dont le nombre décroît. Ils obtiennent à ce stade de développement des proportions similaires à celles trouvées dans les autres cortex. Les interneurones à parvalbumine représentent 45% des interneurones, avec une répartition similaire aux autres aires corticales : 66% des interneurones de la couche IV, 30% des couches II/III, 45% des couches V et VI. Les interneurones à somatostatine représentent 32% des interneurones, avec une répartition homogène entre les couches néocorticales (entre 20% et 33% selon les couches), ce qui diffère de la répartition dans les autres aires corticales (es interneurones à somatostatine sont généralement concentrés dans les couches V/VI). Quant aux interneurones à VIP, ils représentent 18% des interneurones, avec une répartition différente des autres aires corticales. Ils sont généralement concentrés dans les aires II/III mais représentent dans le cortex auditif 30% des interneurones de la couche IV, 18% des interneurones des couches II/III et 13% des couches V/VI. Les interneurones à 5HTR3_A/non-

VIP représentent 5% des interneurones, soit sensiblement moins que dans les autres aires corticales.

Je me concentrerai surtout sur le rôle des interneurones à parvalbumine dans le cortex auditif. **Les interneurones à parvalbumine, notamment en panier, participent à l'inhibition anticipatrice (en anglais, *feedforward inhibition*) au sein des réseaux neuronaux auxquels ils appartiennent.** Lorsque les axones thalamo-corticaux activent les neurones glutamatergiques de la couche IV, ces derniers amplifient le signal reçu et le transmettent aux neurones des couches II/III. Les interneurones à parvalbumine de la couche IV, notamment ceux en panier, reçoivent eux-aussi des afférences thalamo-corticales. Une fois activés, ils inhibent les neurones glutamatergiques de la couche IV. Cette inhibition est forte étant donné que les interneurones en panier connectent leurs neurones cibles au niveau de leur corps cellulaire. Elle permet la fermeture d'une fenêtre temporelle (qui dure entre 1 et 2 ms) au cours de laquelle les neurones glutamatergiques peuvent générer leurs potentiels d'action. L'inhibition anticipatrice participe donc à la précision temporelle de l'intégration des signaux entrant dans le cortex auditif. Elle est dite anticipatrice car les afférences thalamo-corticales connectent en même temps les neurones glutamatergiques et les interneurones GABAergiques de la couche IV. Elle s'oppose à l'**inhibition retour** (en anglais, *feedback inhibition*) principalement opérée par les interneurones à somatostatine : ces derniers inhibent les neurones glutamatergiques qui les activent (**Figure 35**)⁴⁶⁸.

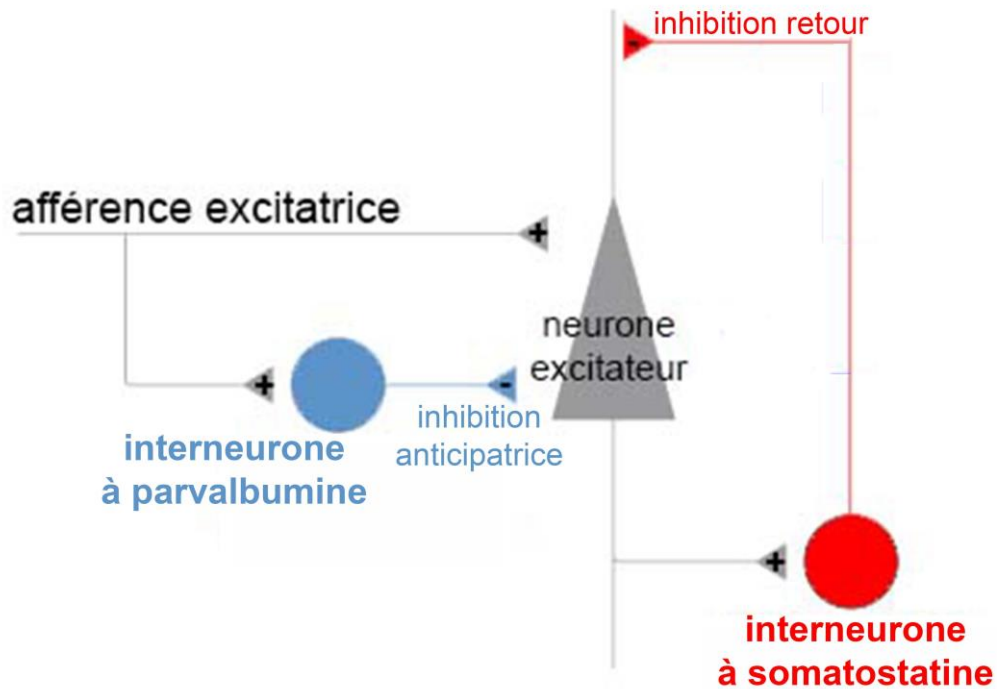


Figure 35 Inhibitions anticipatrice et retour. Les interneurons à parvalbumine participent à l'inhibition anticipatrice en recevant les afférences thalamique (excitatrices) et en faisant synapse (inhibitrice) avec les neurones pyramidaux au niveau de leur corps cellulaire et de leur segment axonal initial. Les interneurons à somatostatine participent à l'inhibition retour en recevant des afférences des neurones pyramidaux (excitatrices) et en faisant synapses avec ces derniers au niveau de leurs dendrites.

Le cortex auditif a **une organisation tonotopique**. Un neurone pyramidal (des couches II/III) répondra préférentiellement à une bande de fréquences : on dit qu'il est accordé en fréquence. Une étude a testé l'hypothèse selon laquelle les interneurons à parvalbumine sont eux aussi accordés en fréquence⁸³. Les auteurs ont montré par optogénétique et électrophysiologie que les interneurons à parvalbumine répondaient à des fréquences spécifiques, tout comme les neurones pyramidaux. Cependant, ils n'apportaient pas d'éléments expérimentaux permettant de savoir si leur accord en fréquence était intrinsèque ou s'il était dû à leur intégration dans un réseau lui-même accordé en fréquence. Deux autres études se sont penchées sur les aspects cellulaires de l'accord en fréquence des couches II et III^{469,470}. Leurs auteurs y montrent, par optogénétique, électrophysiologie, et imagerie bi-photonique, que **c'est surtout l'inhibition qui affine l'accord en fréquence, et surtout celle opérée par les interneurons à parvalbumine grâce à leur réponse très**

rapide. Les interneurones à somatostatine ont une réponse plus lente, ce qui ne leur permet pas de participer à une discrimination, rapide, de deux sons^{59,471}.

Une autre propriété du cortex auditif est l'**adaptation stimulus spécifique**, qui permet de prêter moins d'attention à un son fréquent (dit standard) et davantage aux sons rares (dits déviants). Deux études ont évalué le rôle des interneurones à parvalbumine et à somatostatine dans l'adaptation stimulus spécifique^{472,473}. **Les interneurones à parvalbumine inhibent de manière non-spécifique les réponses aux sons standards et déviants.** Comme les réponses aux sons déviants sont plus élevées, l'inhibition des deux entraîne en moyenne une augmentation de la réponse aux sons déviants. Les interneurones à somatostatine inhibent de manière spécifique les réponses aux sons standards mais n'ont pas d'effet sur les réponses aux sons rares.

Les interneurones à parvalbumine interviennent aussi, mais de manière moins prononcée que les interneurones à somatostatine, dans la détection des interruptions brèves (inférieures à 50 ms) d'un stimulus. La détection de ces interruptions permet de percevoir une information pertinente dans un environnement bruité (la voie d'une personne dans un environnement bruité par exemple)⁴⁷⁴.

Les propriétés du cortex auditif changent au cours du développement. Chez la souris, l'audition commence vers P12 (premiers PEAs enregistrés). A ce stade, il n'y a pas de carte tonotopique corticale fine : les neurones répondent à des bandes fréquentielles larges. L'expérience auditive modèle les propriétés des neurones du cortex auditif. La carte tonotopique s'affine entre P14 et P20 (les neurones répondent à des bandes fréquentielles plus restreintes) et les autres propriétés entre P20 et P40⁴⁶⁷. Le cortex auditif est particulièrement sensible à l'environnement sonore pendant **une période développementale dite critique**, entre P14 et P18, où une privation sensorielle ou un environnement bruité affecte les interneurones corticaux^{56,466,475}. Notons que c'est surtout une déprivation sensorielle ou un environnement bruité pendant cette période qui induit des crises audiogènes⁴⁷⁶.

Les interneurones à parvalbumine participent donc dans le cortex auditif à l'inhibition anticipatrice, son organisation tonotopique, l'adaptation stimulus spécifique et dans une moindre mesure à la détection des interruptions brèves d'un signal. On peut s'attendre à l'existence de défauts pour ces propriétés dans le cortex auditif de souris mutantes pour *Adgrv1*, *Cdhr23* et *Cdhr15*, qui ont un nombre réduit d'interneurones à parvalbumines dans leur cortex auditif.

C. Troubles neurologiques, interneurones et modèles murins

Nous avons vu que *CDHR23*, *CDHR15* et *ADGRV1* ont parfois été associés à des troubles neurologiques (**Introduction VC, VD**) et que *cdhr23*, *cdhr15* et *adgrv1* ont des profils d'expression conservés chez le macaque. Nous pouvons donc nous attendre à des défauts dans le développement des interneurones à parvalbumine du cortex auditif chez les primates. Que sait-on des conséquences cliniques de défauts de développement des interneurones, et en particulier ceux à parvalbumine ?

Les défauts d'interneurones peuvent se présenter sous plusieurs formes. On peut observer une diminution du nombre d'interneurones, d'un ou plusieurs types. Cette diminution peut résulter de la perte ou de la non intégration d'une population de précurseurs d'interneurones. La perte d'une population de précurseurs d'interneurones peut être la conséquence d'un défaut de prolifération ou de migration (causes intrinsèques aux précurseurs ou extrinsèques). La non intégration de précurseurs d'interneurones peut être due à des défauts de lamination ou de synaptogenèse. On peut observer une mauvaise distribution des interneurones, sans modification de leur nombre, au sein d'une colonne néocorticale ou entre plusieurs aires. On peut aussi ne pas observer les défauts précédents mais une diminution de l'expression de marqueurs moléculaires participant à la fonction des interneurones, comme la parvalbumine et les GAD, des défauts métaboliques dans les

interneurones, ou des défauts dans des structures associées aux interneurones comme des nids périneuronaux (en anglais, *perineuronal nets*), formés de matrice extracellulaire, qui protègent les neurones du stress oxydant⁴⁷⁷.

Les patients atteints de schizophrénie, d'épilepsie et d'autisme présentent de tels défauts d'inhibition, et en particulier des interneurones à parvalbumine. Ces défauts apparaissent dans les modèles murins correspondants^{183,213,267,477-483}. Ces troubles neurologiques ont souvent différentes causes, et les modèles génétiques sont hétérogènes. De plus, il est souvent difficile d'identifier si les défauts du développement d'interneurones sont la cause, l'une des causes ou la conséquence du trouble neurologique. Je me concentrerai donc ici que sur des exemples de modèles génétiques avec invalidation de gène dans les interneurones à parvalbumine ou leurs précurseurs, associée à des troubles neurologiques. En me limitant à cette littérature, j'ai conscience de ne pas prendre en compte des structures qui interviennent dans le développement des interneurones et dont des anomalies peuvent entraîner un défaut spécifique aux interneurones. Des interneurones issus de la MGE migrant aussi dans le striatum, il n'est pas improbable que ces derniers soient associés à des troubles neurologiques : par exemple, *ASCL1* a été associé à la **maladie de Parkinson**⁴⁸⁴.

Un des gènes que nous avons rencontrés, *ERBB4*, est associé à la schizophrénie, caractérisée par des **hallucinations auditives**, de la paranoïa, des troubles du langage et de la pensée, des troubles sociaux et souvent associée à des troubles de la mémoire de travail et de l'attention. *Erb4* a été invalidé chez la souris dans des neuroblastes GABAergiques dès le manteau de la MGE (embryons *Lhx6-cre:Erb4^{lox/lox}*). Cette invalidation a été suffisante pour entraîner des défauts de synaptogenèse entre les neurones glutamatergiques et les interneurones à parvalbumine (dans les deux sens), sans modification de la densité des interneurones à parvalbumine. Les animaux étaient moins anxieux que les contrôles, présentaient des défauts d'interaction avec leurs partenaires familiaux (mais pas les nouveaux), ne créaient pas de nid dans la cage, étaient hyperactifs et

présentaient de défauts de la mémoire de travail. **Cette étude montre donc un lien probable entre la synaptogenèse des interneurones à parvalbumine et des défauts comportementaux apparentés à la schizophrénie**⁴⁸⁵. Certains éléments sont en faveur d'un lien entre la migration des précurseurs d'interneurones et la schizophrénie, sans validation expérimentale. Par exemple, *DISC1* ou *NRG1* sont associés à la schizophrénie^{212,277,477} et *nkx2.1* est prédit comme pouvant interagir avec de nombreuses protéines encodées par des gènes associés à ce trouble⁴⁸⁰. Notons qu'une invalidation de *GAD2* chez la souris entraîne une augmentation de l'anxiété, et en particulier la mémoire d'une peur induite par des stimuli auditifs⁴⁸⁶.

Des défauts de développement des interneurones sont souvent associés à l'épilepsie, définie par une hypersynchronie corticale⁴⁸⁷. Par exemple, des mutations pour *PFAFH1B1*, *DCX* et *ARX* sont la cause des malformations cérébrales ou troubles neurologiques dont l'une des caractéristiques ou comorbidités est l'épilepsie. Deux gènes sont directement associés à l'épilepsie : ***SCN1A***, codant pour le canal sodique dépendant du voltage *scn1a* et associé aux syndromes de Dravet (épilepsie myoclonique sévère du nourrisson) et GEFS+ (épilepsie généralisée avec crises fébriles +, en anglais, *generalized epilepsy with febrile seizures +*), et *ERBB4*, associé à l'encéphalopathie myoclonique précoce (un trouble épileptique). Des études ont invalidé chez la souris le gène *Scn1a* dans les interneurones du télencéphale (souris *Dlx1/2l12b-cre:Scn1a^{lox/lox}*) et *Erb4* dans les interneurones à parvalbumine (souris *Pvalb-cre:Erb4^{lox/lox}*). Ces invalidations sont suffisantes pour entraîner une disposition aux crises épileptiques spontanées et aux crises réflexes thermiques (invalidation de *Scn1a*)⁴⁸⁸ ou une plus grande disposition aux crises épileptiques dans un modèle d'induction par stimulations électriques (invalidation de *Erb4*)⁴⁸⁹. Notons que les souris homozygotes mutantes pour *Dlx1* sont disposées à des crises dans un environnement sonore bruyant ou lorsqu'elles sont manipulées par l'expérimentateur^{490,491}. **Ces études illustrent le lien entre le fonctionnement des interneurones, en particulier ceux à parvalbumine, et l'épilepsie.**

Les gènes **MECP2**, **CTNNB1**, **MYH10** et **FMR1** sont souvent associés à diverses formes d'autisme. Une invalidation de *Mecp2* chez la souris dans les interneurons à parvalbumine (*Pvalb-cre:Mecp2^{lox/lox}*) est suffisante pour entraîner des défauts de synaptogenèse des interneurons à parvalbumine et pour annuler la période développementale critique dans le cortex visuel. **Cette étude montre donc un lien entre le fonctionnement des interneurons à parvalbumine et la maturation corticale pendant la période de développement critique, ce qui pourrait contribuer au trouble autistique**⁴⁹². Une invalidation chez la souris de *Ctnnb1* dans les interneurons à parvalbumine (souris *Pvalb-cre:Ctnnb1^{lox/lox}*) est suffisante pour entraîner une augmentation du nombre d'interneurons à parvalbumine dans le cortex préfrontal et une augmentation de l'anxiété accompagnée d'une altération de l'interaction sociale et de gestes stéréotypiques. **Cette étude donne donc un lien entre le fonctionnement des interneurons à parvalbumine, a priori dans le cortex préfrontal, et l'autisme**⁴⁹³. Une invalidation chez la souris de *Fmr1* induit une diminution du nombre d'interneurons corticaux à parvalbumine⁴⁹⁴.

Par conséquent, l'étude des modèles murins de gènes associés à des troubles neurologiques a permis d'illustrer le lien entre un fonctionnement pathologique des interneurons à parvalbumine et la manifestation de signes associés à ces troubles neurologiques. Des gènes associés au développement des précurseurs d'interneurons sont associés à ces troubles neurologiques, sans validation encore par des modèles animaux.

L'existence d'hallucinations auditives chez les patients atteints de schizophrénie ou de **troubles bipolaires** pourrait être associée à des défauts de traitement de l'information sonore dans le cortex auditif, en particulier de l'inhibition dans le cortex auditif^{495,496}. Des troubles d'acquisition du langage chez les enfants avec autisme pourraient être dus à des défauts de fonctionnement du cortex auditif⁴⁹⁷. Des modèles murins non génétiques pour l'autisme révèlent un défaut de traitement de l'information auditive dans le cortex auditif, mais *a priori* indépendamment du nombre des interneurons à parvalbumine, suggérant des

défauts plus fins, à l'échelle du microcircuit⁴⁹⁸. En ce qui concerne des modèles murins génétiques pour l'autisme, par exemple les souris homozygotes mutantes pour *Fmr1*, de tels défauts sont également apparents (avec par exemple, une réponse plus longue à des tons purs, une tonotopie élargie, une temporalité des réponses plus variable ; se rajoutent chez ces souris une période critique anormale et une disposition à des crises audiogènes⁴⁹⁷).

Le cortex auditif, et plus en particulier son inhibition, pourraient donc constituer un module affecté dans ces troubles neurologiques. Il est possible que les personnes portant des mutations pour *CDHR23* ou *CDHR15*, à l'état homozygote ou hétérozygote, et *ADGRV1*, à l'état homozygote, présentent des défauts dans le cortex auditif semblables aux défauts corticaux généralisés de patients atteints d'autisme, de schizophrénie, d'épilepsie ou de troubles bipolaires. Dans tous les cas, des expériences comportementales semblables à celles qui viennent d'être décrites devront être menées avec des animaux mutants pour *Cdhr23*, *Cdhr15* et *Adgrv1* (je n'ai en tout cas pas observé de défauts comportementaux flagrants en plus de la prédisposition aux crises audiogènes).

Malgré la complexité des troubles neurologiques cités, les interneurones peuvent être l'une des causes de ces troubles (ou au moins de certaines de leurs composantes). Dans tous les cas, leur développement, leurs connexions et/ou leur physiologie y sont altérés. Dans le cas de l'épilepsie, certaines formes peuvent être traitées par des médicaments antiépileptiques mais 30 à 40% des patients atteints d'épilepsie sont résistants à ces médicaments. Si le foyer épileptique est détecté et accessible, il peut être retiré par chirurgie et certaines formes peuvent être atténuées par un régime cétoène (avec peu de glucides et riche en lipides)⁴⁹⁹. Cependant, ces différentes approches ne permettent pas de traiter de possibles comorbidités neurologiques associées à l'épilepsie. De plus, aucun traitement médicamenteux n'existe spécifiquement pour la schizophrénie et l'autisme. **Une des approches pour remplacer des interneurones inexistantes ou rétablir l'inhibition**

pourrait être une transplantation d'interneurones. Les cellules transplantées peuvent provenir de précurseurs GABAergiques (notamment provenant de la MGE), de cellules souches embryonnaires, à partir desquelles nous avons vu qu'il est possible de contrôler la formation d'interneurones à parvalbumine ou somatostatine (**Partie IA**), ou de **cellules souches pluripotentes induites** (l'expression d'*Ascl1* et *Dlx2* est suffisante pour la différenciation de cellules en neurones GABAergiques fonctionnels⁵⁰⁰)^{499,501-503}.

Dans différents modèles d'épilepsie (génétiques ou induits) chez les rongeurs, en particulier d'épilepsie du lobe temporal, ces transplantations ont permis de diminuer la disposition des animaux aux crises épileptiques. En ce qui concerne la mémoire à court ou long terme, les études sont contradictoires. De plus, les effets à long terme d'une transplantation sont mal connus^{499,502,504}.

Quelques études se sont concentrées sur des transplantations de précurseurs d'interneurones dans l'hippocampe de modèles murins (génétiques et non génétiques) de schizophrénie. Il est apparu une diminution de l'hyperactivité des animaux ainsi qu'une augmentation des capacités d'apprentissage et de mémorisation. Une étude similaire de transplantation dans le cortex préfrontal a corrigé certains traits comportementaux : exploration de nouveaux objets et une réponse normale à des stimuli acoustiques (en anglais, *startle reflex*)⁵⁰¹. **Ces résultats sont donc encourageants pour corriger l'activité de certaines régions télencéphaliques dans des modèles de schizophrénie, mais ne permettent pas de corriger tous les défauts comportementaux.**

Des interneurones transplantés issus de la MGE arrivent à s'intégrer à long terme dans le cortex visuel de souris et sont fonctionnels. Leur transplantation permet d'« ouvrir » à nouveau la période développementale critique⁵⁰⁵, c'est-à-dire que le cortex visuel peut modifier ses cartes de représentation sensorielle en s'adaptant à l'environnement visuel. La transplantation d'interneurones pourrait donc être une voie d'approche pour corriger une maturation du cortex auditif, qui aurait été altérée par un environnement sonore trop bruyant ou au contraire dont le spectre fréquentiel aurait été appauvri⁵⁰⁴.

Afin d'être opérante, une transplantation de précurseurs d'interneurones doit prendre en compte la nature du défaut d'inhibition (le trouble neurologique est-il dû à trop ou peu d'inhibition ? Le défaut d'inhibition est-il localisé ou généralisé ?), **les règles locales d'intégration des interneurones** (une fraction des interneurones de même origine clonale se regroupent dans le néocortex ; mon travail de thèse montre l'existence d'une population de neuroblastes GABAergiques adressée à une aire néocorticale donnée ; entre 15 et 20% seulement des précurseurs d'interneurones transplantés survivent⁴⁹⁹, soit moins qu'*in vivo* ou 60% des interneurones immatures survivent après la phase d'apoptose), **les règles d'intégration postnatale alors que les interneurones sont déjà intégrés dans un réseau et d'intégration dans un réseau pathologique, l'intégration à long terme des cellules transplantées, l'origine des interneurones et leur cinétique de développement différentes chez l'humain** (nous avons vu que des interneurones naissent dans la zone sous-ventriculaire externe corticale, en quoi ces interneurones diffèrent de ceux provenant de la MGE et de la CGE n'est pas encore bien établi ; de plus, la cinétique de développement neuronale est plus lente chez l'humain⁵⁰²). Une telle transplantation devra **non seulement diminuer les défauts neurologiques majeurs** (par exemple la disposition aux crises épileptiques) **mais aussi rétablir les fonctions plus fines des régions pathologiques et la possibilité d'effets secondaires non souhaités** (il faudra par exemple s'assurer de l'impossibilité pour les cellules transplantées d'entrer en mitose ce qui pourrait former des tumeurs ; certains animaux deviennent hyperactifs après transplantation des précurseurs d'interneurones⁴⁹⁹).

Une des limites de la transplantation de cellules souches embryonnaires est que ces cellules viennent de cerveaux ou de tissus de fœtus humains. Cela pose des questions éthiques ainsi que des questions techniques. A quel stade prélever les cellules ? Doit-on seulement considérer la MGE ou également la zone sous-ventriculaire externe ? Comment générer tous les types d'interneurones et en quantité suffisante ? Comment ne transplanter que les cellules d'intérêt ? Quel est le génome de ces cellules ? C'est pourquoi les cellules souches pluripotentes induites pourraient pour ces raisons être plus pratiques. Leur

transplantation demande cependant de connaître le programme génétique des cellules à greffer (nous avons vu qu'il est connu chez la souris pour les grands types cardinaux d'interneurones mais pas pour leurs sous-types et si l'humain semble montrer des profils d'expression semblables des molécules participant à ce programme, ce programme n'y est pas encore bien connu) et éventuellement de corriger des mutations qui seraient présentes dans le génome du patient.

D. Perspectives

On peut envisager comme perspectives d'étudier chez les souris prédisposées aux crises audiogènes le fonctionnement de leur cortex auditif à l'état basal et pendant une crise audiogène, aux stades de la manifestation des crises (P21-P27) et aux stades précédents et ultérieurs. On peut aussi imaginer la création de lignées murines exprimant de manière conditionnelle sous la dépendance des promoteurs de *Cdhr23* et *Cdhr15* des molécules permettant de contrôler l'activité des interneurones issus des neuroblastes GABAergiques synthétisant *cdhr23* et *cdhr15* (par exemple, par optogénétique). Cela permettrait d'étudier les caractéristiques électrophysiologiques propres à ces interneurones, si elles existent, ou en tout cas aux interneurones à parvalbumine du cortex auditif. De plus, la région des ganglions de la base contenant des interneurones issus de neuroblastes, ayant exprimé *cdhr23* et *cdhr15*, devra être précisée.

Par ailleurs, les précurseurs d'interneurones issus de la MGE participent au développement des oligodendrocytes par une action paracrine. L'absence de ces précurseurs dans le cortex, limite le développement des oligodendrocytes⁵⁰⁶. Il serait ainsi intéressant d'étudier le développement des oligodendrocytes dans le cortex auditif des animaux mutants chez qui une diminution du nombre d'interneurones est observée.

Ces études chez la souris permettront d'établir une liste de défauts possibles chez les patients atteints d'USH1 et USH2, ainsi que chez les parents des patients atteints d'USH1.

Des études cliniques chez ces populations pourraient permettre d'identifier des défauts fonctionnels du cortex auditif ou des troubles neurologiques plus larges. Les patients atteints d'USH1 portent généralement des implants cochléaires, sensés rétablir la perception auditive, partant du principe que le cortex auditif s'adaptera par plasticité neuronale aux signaux envoyés par l'implant cochléaire⁵⁰⁷. Il se pourrait que ce ne soit pas le cas. Cela expliquerait pourquoi certains patients avec des mutations pour *CDHR23* et *CDHR15* ont des difficultés à comprendre le langage suite à la pose d'un implant cochléaire (**Introduction Partie VC**).

III. Proposition : il existe des populations de neuroblastes GABAergiques adressés à des régions télencéphaliques précises selon un « code d'adhérence cellulaire »

Mes résultats indiquent que des protéines d'adhérence sont co-exprimées par une population de neuroblastes GABAergiques à partir de leur stade postmitotique dans la région ventrale du manteau de la MGE, à partir de E13,5 (elles ne sont plus détectées dans le manteau de la MGE à E14,5-E15,5). Elles sont exprimées jusqu'à ce que ces neuroblastes arrivent dans des régions des ganglions de la base ainsi que le cortex auditif, uniquement. A ce stade, 30% des neuroblastes GABAergiques du cortex auditif issus de la MGE co-expriment les deux protéines. A E18,5, le marquage pour les deux protéines d'adhérence est restreint au cortex auditif, et à P27 une baisse du nombre d'interneurones à parvalbumine n'est observée que dans le cortex auditif.

Se pose donc la question d'un possible code moléculaire, et plus particulièrement d'un « code d'adhérence cellulaire », permettant d'adresser les neuroblastes GABAergiques à une aire néocorticale donnée. Cela signifie qu'il existerait plusieurs populations de neuroblastes GABAergiques portant des protéines d'adhérence différentes, populations et protéines qui seraient spécifiques d'aires corticales restreintes. J'ai évoqué la question d'un possible regroupement d'interneurones de même origine clonale. Il est possible que la population de neuroblastes GABAergiques que j'ai étudiée soit d'origine clonale. Il est aussi possible qu'elle se distingue d'autres populations lors d'étapes post-transcriptionnelles. Dans ce cas, le code s'établirait au moment de la différenciation des neuroblastes dans le manteau de la MGE, et avant ou indépendamment de la ségrégation des populations à destination néocorticale et striatale. Si un tel code existe, il faudra identifier d'autres populations GABAergiques dans le manteau de la MGE, dont les protéines d'adhérence présenteraient des profils d'expression à E18,5 restreints à une ou quelques aires

fonctionnelles néocorticales. Nous avons vu que le répertoire des cadhérines, exprimées de manière combinatoire, n'est pas suffisant pour adresser les neuroblastes à toutes les colonnes néocorticales mais seulement pour un adressage rudimentaire. L'adressage à des aires néocorticales pourrait constituer cet adressage rudimentaire. Il a été proposé que l'existence d'un code moléculaire rudimentaire, dans l'espace (des profils large d'expression de ses composantes moléculaires), dans le temps (le code peut être nécessaire à l'intégration d'un neurone seulement à un stade développemental donné) et dans sa force (des effets stochastiques peuvent être nécessaire). L'activité du réseau neuronal, dépendante par exemple de l'environnement sensoriel, permettrait ensuite d'affiner les connexions synaptiques⁵⁰⁸.

Nous avons vu qu'une fraction seulement des interneurons de même origine clonale sont dans plusieurs structures télencéphaliques. Il serait intéressant de savoir si les neuroblastes GABAergiques exprimant *cdhr23* et *cdhr15* sont adressés aux régions auditives des ganglions de la base et s'il existe un code d'adressage aux régions télencéphaliques participant à la même fonction. La réponse à cette question permettrait de savoir si l'existence d'un « code d'adhérence cellulaire » participerait à la mise en place de réseaux neuronaux et/ou à l'adressage d'interneurones ayant des propriétés, par exemple électrophysiologiques, différentes. Le partage d'un code entre les différentes structures télencéphaliques permettrait de diminuer la finesse de ce code.

Seulement 30 à 50% des précurseurs d'interneurones à parvalbumine du cortex auditif co-expriment *cdhr23* et *cdhr15*, en provenance des deux flux de migration tangentielle. Il faudra préciser si seulement une fraction des interneurons à parvalbumine est concernée par un « code d'adhérence cellulaire », si les interneurons à somatostatine et ceux issus de la CGE sont adressés eux aussi à des aires néocorticales données, ce que suggère l'étude publiée en 2013 par Ciceri *et al.*¹⁵⁹.

A quel moment participerait ce code ? C'est-à-dire, à quel moment les aires corticales de destinations exprimeraient de manière spécifique des protéines d'adhérence interagissant avec celles portées par les neuroblastes GABAergiques ? Nous pouvons imaginer que c'est au moment de l'entrée dans la plaque corticale, et donc de l'entrée en migration radiaire, ainsi qu'au moment de la synaptogenèse que ce code interviendrait. Nous avons en effet vu que les neuroblastes GABAergiques contactent la glie radiaire avant d'entrer dans la plaque corticale et que tous n'adoptent pas le même comportement suite à ces contacts. De plus, suite à la migration et au début de la synaptogenèse, 40% des interneurons immatures entrent en apoptose. Si un code moléculaire d'adressage des interneurons immatures existe, des protéines d'adhérence situées sur la glie radiaire ou exprimées par les neurones pyramidaux pourraient le lire, en interagissant avec les molécules d'adhérence exprimées par les neuroblastes GABAergiques. Cela pourrait expliquer pourquoi seulement une partie des neuroblastes GABAergiques greffés dans un cortex s'y intègrent. Pour tester cette hypothèse, il faudra utiliser des souris rapporteuses sous le contrôle par exemple du promoteur de *Cdhr23* ou *Cdhr15* afin d'identifier si ce sont bien les interneurons immatures non marqués qui entrent en apoptose dans le cortex auditif et des interneurons immatures marqués qui entrent en apoptose dans d'autres cortex. De plus, il conviendra de déterminer si un tel code d'adhérence repose principalement sur des interactions attractives ou répulsives.

Les protéines d'adhérence impliquées dans ce code pourraient intervenir de manière secondaire dans d'autres mécanismes : par exemple, l'interaction avec le substrat pendant la migration tangentielle ou la participation aux propriétés intrinsèques migratoires des neuroblastes GABAergiques, comme la polarité cellulaire. En effet, si je n'observe pas d'entrée dans le néocortex des neuroblastes GABAergiques exprimant *cdhr23* ou *cdhr15* chez les embryons mutants homozygotes pour *Cdhr15* ou *Cdhr23*, ce n'est peut-être pas par absence de lecture du « code d'adhérence » proposé mais une conséquence du rôle subcellulaire de *cdhr23* et *cdhr15*. L'absence d'entrée de ces neuroblastes dans le néocortex

des mutants *Adgrv1*^{-/-} suggère toutefois une lecture de ce code en amont de la migration radiaire.

En conclusion, fondée sur les résultats obtenus, l'existence d'un « code d'adhérence cellulaire » d'adressage des neuroblastes GABAergiques à des régions télencéphaliques précises, est proposée. La découverte d'autres populations de neuroblastes GABAergiques adressées à d'autres aires néocorticales que le cortex auditif, qui synthétiseraient des molécules d'adhérence distinctes, d'une part, et d'autre part de leurs interactants dans les régions de destination, confirmerait cette hypothèse. L'expression différentielle de ces molécules pourrait s'opérer dès le stade progéniteur et correspondre à des populations d'interneurones d'origine clonale mais pourrait aussi s'opérer de manière post-transcriptionnelle au moment de la différenciation des neuroblastes dans le manteau de la MGE. Ce « code d'adhérence » pourrait intervenir au moment de l'entrée en migration radiaire ou de la synaptogenèse, éventuellement en amont, pendant la migration tangentielle.

Matériel et méthodes

Animaux. L'expérimentation animale a été effectuée selon la réglementation française et européenne concernant le bien-être animal (directive européenne 2010/63 et décret français 118 du 1^{er} février 2013), avec l'accord du comité d'éthique de l'Institut Pasteur. Les lignées murines *Adgrv1*^{tm1Msat} (*Adgrv1*^{+/-} et *Adgrv1*^{-/-}) et *Adgrv1*^{YFP} (*Adgrv1*^{+YFP} et *Adgrv1*^{YFP/YFP}), *Nkx2.1-cre*, et celles exprimant de manière constitutive la RFP ont été généreusement cédées par Makoto Sato (Université de Fukui, Japon)^{407,411}, Nicoletta Kessarlis (University College London, Royaume-Uni)²⁴, et Anna-Katerina Hadjantonakis (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, Etats-Unis), respectivement. Les souris *Cdhr15*^{av-3J}, qui portent une mutation ponctuelle conduisant à un décalage de la phase de lecture et l'apparition d'un codon-stop anticipé au sein de *Cdhr15*, et *Rosa-tdTomato*, ont été obtenues des Jackson Laboratories (Bar Harbor, Etats-Unis). Les souris *Cdhr23*^{ex61-68-fl} (*Cdhr23*^{lox/lox}), *Cdhr23*^{tm1.2Ugds} (*Cdhr23*^{+/-} et *Cdhr23*^{-/-}), *otogéline*^{tm1Prs} (*otogéline*^{-/-}), et *stéréociline*^{ex2-3} (*Strc*^{-/-})⁵⁰⁹, ont été décrites dans des articles publiés^{510,511,512}. Les souris *Cdhr15*^{ex5-fl} (*Cdhr15*^{lox/lox}) ont été générées par l'Institut Clinique de la Souris (iCS, Illkirch, France)⁴¹². Les souris avaient un fond génétique mixte (C57BL/6JRj et SV/129 ; C57BL/6JRj, SV/129 et Swiss pour les souris *Rosa-tdTomato*). Les souris sauvages sont toujours des animaux des mêmes portées que les souris mutantes, excepté pour l'expérience d'injection de vecteur lentiviral qui a été faite sur des animaux C57BL/6JRj en provenance de Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). Les souris mutantes ont été élevées à l'animalerie Monod de l'Institut Pasteur, exceptées les souris *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato*, *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato:Cdhr23*^{lox/lox} et *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato:Cdhr23*^{lox/lox} qui ont été élevées à l'animalerie Lwoff de l'Institut Pasteur. Les différentes lignées murines élevées au laboratoire ont été entretenues par Typhaine Dupont, Céline Trébeau et Sébastien Le Gal.

Tests auditifs. Les souris ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale de xylazine (7.5 mg/kg) et kétamine (75 mg/kg). Les PEAs⁵¹³ ont été enregistrés en réponse à des tons purs dont la fréquence était de 5, 10, 15, 20, 32, et 40 kHz. Les intensités sonores étaient entre 15 dB et 115 dB SPL, de 5 dB en 5dB SPL. Les PEAS étaient moyennées sur 100 à 200 stimulations. Les seuils des PEAs ont été définis au niveau sonore le plus bas résultant des ondes reconnaissables. L'amplitude de l'onde I des PEAS a été estimée en mesurant la différence de voltage entre le pic de l'onde I et le creux entre l'onde I et l'onde II. La latence de l'onde I a été mesurée comme étant la différence entre l'envoi du son et l'apparition du pic de l'onde I. Les réponses des électrodes ont été amplifiées (gain de 10 000), filtrées, converties de manière digitale, et moyennées avec un système d'acquisition compressif.

Les OEAs des produits de distortion ont été enregistrées avec un microphone miniature à l'entrée du canal auditif⁵¹⁴. Deux sons purs primaires ont été envoyés de manière simultanée (sons de fréquences f_1 et f_2) : f_2 était comprise entre 5 et 20 kHz et le ratio f_2 / f_1 était de 1.2. Le son de différence cubique à $2f_1 - f_2$, le produit de distortion le plus important produit par l'oreille des mammifères, a été mesuré pour des fréquences sonores primaires d'intensité égale, de 40 à 75 dB SPL.

Les PEAs et les OEAs des produits de distortion ont été mesurés par Paul Avan (excepté par les souris injectées d'un vecteur lentiviral).

Stimulations sonores. La disposition aux crises audiogènes a été testée en envoyant aux animaux des sons purs à partir d'un haut-parleur calibré (de 5 kHz à 40 kHz) placé au dessus d'un cylindre large en plexiglas (hauteur : 30 cm, diamètre : 15 cm) contenant les souris libres de leurs mouvements. Les stimulations sonores ont été arrêtées dès le début de la course folle afin d'empêcher l'apparition des autres étapes des crises audiogènes. J'ai évalué la proportion des animaux manifestant des crises audiogènes entre P21 et P35, avec des stimulations de haute intensité (100-110 dB SPL) de basse fréquence (entre 8 et 15 kHz) pendant au plus 1 minute.

Injection de vecteur lentiviral. Les souriceaux ont été anesthésiés par hypothermie à P1 ou par isoflurane à P10 (4% d'isoflurane pendant l'induction, 2% sous masque). J'ai utilisé un microinjecteur (Nanoliter 2000, World Precision Instruments, Sarasota, USA) pour injecter 70 nL de vecteur lentiviral (*Pgk::cre-GFP* ou *Pgk::GFP*, 10^7 TU/mL, Kerafast, Boston, USA) de manière bilatérale dans le cortex temporal afin de cibler le cortex auditif, ou dans le cortex dorsal, pour cibler le cortex moteur.

Anesthésie des souriceaux. Dans le cadre du protocole d'injection du vecteur lentiviral, le comité d'éthique de l'Institut Pasteur avait demandé à Julie Catteau (Unité de Neurobiologie Intégrative des Systèmes Cholinergiques) et moi-même de réaliser une étude comparative de l'anesthésie des souriceaux (de P0 à P1) sur la glace ou à l'isoflurane. La littérature scientifique apporte peu d'informations sur l'anesthésie des souriceaux, notamment sur son efficacité et ses effets négatifs lors de l'acte chirurgical et le développement post-natal des souris. Dans ce projet, nous avons comparé l'anesthésie à l'isoflurane et l'hypothermie, deux techniques utilisées pour anesthésier les souriceaux. En effet, le souriceau n'a pas la même sensibilité que l'adulte aux anesthésiques et il apparaît nécessaire d'adapter les procédures utilisées aux particularités de l'âge postnatal.

Concernant l'anesthésie par hypothermie (33 petits), les souriceaux ont été placés sur la glace, recouverte d'un gant pour éviter un contact direct. Concernant l'anesthésie par isoflurane (33 petits), les petits ont été placés dans une chambre d'induction avec un flux d'isoflurane à 4% jusqu'à endormissement complet, puis l'anesthésie a été maintenue grâce à un masque et un flux à 2% d'isoflurane.

Une aiguille avec butée a été plantée dans les deux hémisphères des petits (P1) anesthésiés, dans la région du cortex moteur (1 mm latéral, 1 mm postérieur, 1 mm de profondeur, par rapport au bregma). Dans les deux cas, les souriceaux ont été placés sur une plaque chauffante avant de retourner avec leur mère. Deux groupes ont été constitués pour chaque portée : anesthésiés à l'isoflurane ou sur glace (repérés par tatouage à la patte antérieure droite ou gauche).

Les vitesses d'endormissement et le taux de mortalité entre le début de l'anesthésie et le retour à la mère ont été mesurés. Les animaux ont ensuite été suivis quotidiennement. Nous avons été attentifs aux signes de douleur comme une mauvaise prise alimentaire qui peut être due, au départ, à un rejet de la mère ou à un problème du petit. Dans ce cas, le petit est visiblement plus petit et/ou d'une couleur différente. Son estomac peut apparaître vide alors qu'il devrait être rempli de lait. D'autres signes évalués comme représentatifs d'une douleur ont été l'exclusion du petit du groupe de la portée, le plus souvent dans le nid, ainsi que sa mobilité. Les conséquences de la procédure sur les petits des deux groupes (mortalité éventuelle, problèmes divers décrits précédemment) ont été mesurées jusqu'à P35, stade où leur disposition aux crises audiogènes a été observée. Les animaux ont été mis à mort à ce stade.

Le temps moyen d'endormissement par hypothermie a été de 4,2 minutes (+/- 1,3) et l'acte chirurgical d'environ 40 secondes (+/- 10) ; la durée totale sur la glace a donc été de 4,9 minutes (+/- 1,4). Le temps moyen d'endormissement sous isoflurane a été de 49 secondes (+/- 17, $p < 10^{-15}$, test de Student) et sous masque d'environ 49 secondes (+/- 40, $p > 0.05$, test de Student) ; la durée totale moyenne sous anesthésie a donc été de 1,6 minutes (+/- 0,8, $p < 10^{-14}$, test de Student). L'expérience a été menée sur 59 petits (29 anesthésiés à l'isoflurane et 30 par hypothermie) issus de 5 portées. Tous ont survécu et se sont bien portés jusqu'à P35. Les proportions de souris manifestant des crises audiogènes ne sont pas significativement différentes ($p > 0.05$, test Chi²), même si une tendance indique une disposition plus faible si l'anesthésie est par hypothermie (10% versus 22%).

En conclusion, dans notre expérience, l'anesthésie n'a pas d'influence sur la survie et la bonne santé des animaux. L'anesthésie à l'isoflurane est plus rapide, les animaux anesthésiés sur la glace montrent une tendance non significative à une plus faible disposition aux crises audiogènes. Si les deux types d'anesthésie semblent comparables en ce qui concerne la survie des animaux, l'anesthésie à l'isoflurane peut se révéler plus pratique car beaucoup plus rapide. En revanche, elle ne serait pas conseillée dans des modèles de crises audiogènes.

Préparation des tissus. Les tranches cryoconservées de cerveau d'embryon (E63 et E85) de macaque (*Macaca fascicularis*) ont été fournies par Colette Dehay (plateforme PrimaLyon, Institut Cellule Souche et Cerveau, INSERM, Bron, France). Pour estimer l'âge des embryon, l'apparition des bouchons vaginaux après accouplement des femelles avec les mâles a été considérée comme correspondant au stade embryonnaire E0,5. Les embryons de souris ont été disséqués et fixés par immersion dans 4% de paraformaldéhyde (PFA) dans un tampon phosphate salin (PBS, pour phosphate-buffered saline). Les cerveaux des souriceaux ont été sortis de la boîte crânienne avant leur fixation dans la solution de 4% de PFA dans le PBS. Aux stades plus tardifs, les souris ont été anesthésiées profondément par un mélange de xylazine (60 mg/kg) et kétamine (150 mg/kg) par injection intrapéritonéale avant de subir une perfusion intracardiaque de 4% de PFA dans du PBS. Les tissus embryonnaires murins ont été fixés pendant trois jours dans le mélange de PFA dans le PBS, puis lavés dans du PBS, avant d'être inclus dans 2% d'agarose pour obtenir des tranches flottantes (50 µm d'épaisseur) à l'aide d'un vibratome (Leica Biosystems, Wetzlar, Allemagne), ou pendant la nuit avant d'être lavés dans du PBS, cryoprotégés par immersion dans une solution de 30% de sucrose dans du PBS et cryoconservés par inclusion dans de l'*optimal cutting temperature compound* (VWR International, Radnor, USA) pour obtenir des tranches au cryostat (20 µm d'épaisseur). Après P20, j'ai réalisé des tranches flottantes de 50 µm d'épaisseur à l'aide du cryostat. Quand cela était nécessaire, les tranches ont été déposées sur des lames Superfrost Plus (Menzel-Gläser, Braunschweig, Allemagne).

Immuno-marquages. Suite au tranchage des tissus, les tranches ont été perméabilisées dans une solution de 0,25% de Triton X-100 dans du PBS (Sigma-Aldrich) et bloqués dans une solution de 1% d'albumine de sérum bovin (AppliChem, Darmstadt, Allemagne) dans du PBS. Les anticorps primaires ont été appliqués dans une solution de 0,1% de Triton X-100 et de 1% d'albumine de sérum bovin dans du PBS.

Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : sérum de lapin anti-adgrv1 (région N-terminale) (1:100; utilisés pour les immuno-marquages présentés en **Figures 29 et 30** ;

anticorps précédemment décrit⁵), et anticorps polyclonal de lapin anti-adgrv1 (région C-terminale) (1:500; utilisés pour les immuno-marquages présentés en **Figures 31 et 32** ; précédemment décrit³⁸⁸), anticorps polyclonal de lapin anti-casp3 (1:500; #HPA002643, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis), anticorps polyclonal de lapin anti-cdhr23 (épitope dans la partie extracellulaire comprenant EC11) (1:300; C1EC11, précédemment décrit³⁸⁸), anticorps polyclonal de lapin anti-cdhr15 (épitope dans la partie extracellulaire proche du domaine transmembranaire) (1:300; P1ExJM, précédemment décrit³⁸⁸, utilisés dans les immuno-marquages présentés en **Figures 17C, 18, 20A (coronal), 20B, 20D, 21A, 23A, 23C, 23E-F, 28A, 31, 32**), anticorps monoclonal de souris anti-cdhr15 (épitope dans a partie extracellulaire comprenant EC7 et EC10 (1:300; #sc-377235, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Etats-Unis ; utilisés dans les immuno-marquages présentés en **Figures 17E, 19B, Figures 20A (horizontal), 20C, 21B, 29F**), anticorps polyclonal de lapin anti-doublecortine (1:2000; #ab18723, Abcam, Cambridge, Royaume-Uni), anticorps monoclonal de souris anti-dlx5 (1:500; #SAB1412173, Sigma-Aldrich), anticorps polyclonal de poulet anti-GFP, reconnaissant aussi la YFP (1:1000; #ab13970, Abcam), anticorps monoclonal de souris anti-nestine (1:1000; #556309, BD Biosciences, Franklin Lake, Etats-Unis), anticorps polyclonal de lapin anti-MKI67 (1:100; #ab15580, Abcam), anticorps monoclonal de souris anti-parva (1:500; #SAB4200545, Sigma-Aldrich), anticorps polyclonal de lapin anti-RFP, reconnaissant aussi tdTomato (1:2000; #3993-100, Clontech Laboratories, Mountain View, Etats-Unis), anticorps polyclonal de lapin anti-sst (1:250; #ab22682; Abcam) et anticorps monoclonal de souris anti- γ -tubuline (1:500; #T6557; Sigma-Aldrich).

Les épitopes détectés par les anticorps de lapin anti-cdhr23, anti-cdhr15, et de souris anti-dlx5 sont conservés chez les protéines analogues chez le macaque. L'épitope de souris détecté par l'anticorps de lapin anti-adgrv1 (region C-terminale) est à 93% identique chez le macaque. Les anticorps de lapin anti-cdhr23, anti-cdhr15, et anti-adgrv1 (region C-terminale) ont déjà été utilisés chez le macaque³⁸⁸. L'anticorps de souris anti-nestine a été montré comme fonctionnant chez les primates (DSHB Hybridoma Bank).

Les anticorps secondaires suivants ont été utilisés (1:500) : anticorps de chèvre anti-poulet Alexa Fluor 488 (#A11039; Life Technologies, Waltham, Etats-Unis), anticorps de chèvre anti-souris Alexa Fluor 488 (#A21121; Life Technologies), Atto550 (#43394; Sigma-Aldrich), et Atto647 (#50185; Sigma-Aldrich), anticorps de chèvre anti-lapin Atto488 (#18772; Sigma-Aldrich), Atto550 (#43328; Sigma-Aldrich) et Atto647N (#40839; Sigma-Aldrich).

Quand deux anticorps primaires produits dans la même espèce ont été utilisés, le même protocole a été suivi mais en deux étapes⁵ : une protéine a été immuno-marquée puis le tissu a été fixé dans une solution de PFA 4% dans du PBS pendant 30 minutes, puis lavé, et ensuite immuno-marqué pour la seconde protéine.

Les filaments d'actines ont été révélés par de la phalloïdine Atto-565 (1:1000, #94072, Sigma-Aldrich). Les noyaux cellulaires ont été révélés par du 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1:7500, #D9542, Sigma-Aldrich). L'apoptose a été révélée par la méthode TUNEL (pour *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling*) (Roche, West Sussex, Royaume-Uni)⁵¹⁵.

Les échantillons ont été montés dans du Fluorsave (Calbiochem, San Diego, Etats-Unis). Les images ont été acquises avec un microscope confocal LSM-700 (Zeiss, Oberkochen, Allemagne) avec un objectif 63x NA 1.4 à plan apochromatique et à immersion à huile, un objectif 25x NA 0.8 LCI à plan Neofluar à immersion à huile, un objectif 5x NA 0.16 à plan apochromatique sans immersion, ou un objectif 20x NA 0.8 à plan apochromatique sans immersion, ou un microscope MVX10 (Olympus Tokyo, Japon). Toutes les images ont été converties au format RGB avec ImageJ (NIH, Bethesda, Etats-Unis) et traitées avec Photoshop (Adobe, San José, Etats-Unis). Les images des **Figures 17B-C, 18, 19B, 20A, 21A, 21B (immuno-marquage cdhr23/cdhr15), 22A, 24A & 24C (larges vues), 27A, 29A (larges vues), 29E-F, 29H-I (vues zoomées), 31, 32** sont des simples plans. Les images des **Figures 17D-E, 20B-D, 21B (marquage γ -tubuline), 22B, 23B-C, 23E-F, 24A & 3C (vues zoomées), 24E, 27B, 28A-D, 29A (vues zoomées), 29C, 29G, 29H-I (larges vues)** sont des projections moyennes de plans dans l'axe des Z.

Certaines images représentatives ont été prises avec Vincent Michel. La plupart des figures issues de l'article de thèse ont été montées par Nicolas Michalski.

Quantification des marquages sur tranches histologiques. Le nombre de corps cellulaires cdhr23/cdhr15/tdTomato, tdTomato, parva ou sst a été quantifié avec l'outil "spot detector" (points lumineux sur un fond noir ; sensibilité : 100%) du logiciel Icy⁵¹⁶ (Institut Pasteur, Paris, France). Seulement les corps cellulaires d'un diamètre supérieur à 10 µm ont été considérés. La fluorescence moyenne des tranches à E14,5 sections a été mesurée avec ImageJ, en comparant les régions d'intérêts dans le subpallium et le cortex embryonnaire adjacent. L'épaisseur de la plaque corticale et la surface du cortex auditif ont été mesurées avec le logiciel Icy (étude à partir d'un marquage pour le DAPI) sur cinq tranches successives (la tranche la plus antérieure est celle où commence l'aire AI, la plus postérieure, celle où le troisième ventricule disparaît).

Cultures d'explants de MGE et quantification de la migration. Des lamelles de verre stériles ont été recouvertes de polylysine/laminine (*Poly L Lysine hydrobromide* #P1524, Sigma-Aldrich; laminine #L2020, Sigma-Aldrich) ou de polylysine/laminine/cdh2, comme décrit dans Luccardini *et al.*, 2013³⁷⁴. Le substrat cdh2 a été préparé à partir d'une chimère cdh2-h-Fc (#6626-NC-050, Bio-Techne, Minneapolis, Etats-Unis). Chaque MGE d'embryons à E13,5 a été disséquée en sectionnée en 9 explants, placés sur le substrat et cultivés 19 heures sur la laminine ou 24 heures sur cdh2/laminine dans du DMEM-F12 (#31331028, Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis) complété de 37% de glucose (#G7021, Sigma-Aldrich), de 2% de B27 (#17504044, Fisher Scientific), de 1% de N2 (#17502048, Fisher Scientific), de 1% de Glutamax et de 20 U/mL de pénicilline/streptomycine (#15140122, Fisher Scientific). Les explants de MGE ont été fixés par incubation dans du PFA 4% dans un tampon phosphate contenant 0,33 M de sucrose pendant 24 heures, avant de suivre le protocole d'immuno-marquage. Dans le cas de l'immuno-marquage présenté en

Figure 21B (immuno-marquage *cdhr23/cdhr15*), les échantillons n'ont pas été perméabilisés. J'ai réalisé ces expériences sous l'encadrement de Christine Métin.

Pour les greffes d'explants de MGE dans des tranches télencéphaliques, des tranches de 250 μm ont été tranchées à l'aide d'un vibratome manuel, greffées d'un explant de MGE dans leur subpallium à l'aide d'une pipette en verre et cultivées 24 heures, dans les mêmes conditions que sur substrat synthétique. Cette expérience a été réalisée par Christine Métin.

Avec Jacques Boutet de Monvel, nous avons caractérisé les différences des profils de migration entre les neuroblastes sauvages et sans *cdhr23* ou *cdhr15*, en considérant une population de neuroblastes isolés de l'explant suite à leur migration. Ont été analysées les caractéristiques géométriques des processus et des lamellipodes des neuroblastes sélectionnés et segmentés manuellement sur des images issues de projections de plusieurs plans dans l'espace en utilisant une interface Matlab. Nous avons mesuré l'angle entre le vecteur allant du centrosome au centre du noyau et l'axe du processus conducteur dans les cellules unipolaires.

La surface de migration (autour de l'explant, en excluant l'explant) a été mesurée avec le logiciel Icy. Pour les cultures sur laminine, j'ai sommé les aires de migration des 9 explants pour chaque MGE. Pour les cultures sur *cdh2*/laminine et de greffe d'explant dans des tranches télencéphaliques, j'ai considéré individuellement pour chaque MGE les trois explants avec l'aire la plus grande. Dans ce dernier cas, l'aire de migration marquée pour l'actine était de $1,67 \pm 0,33 \text{ mm}^2$ ($n = 17$) pour les explants sauvages, $1,35 \pm 0,20 \text{ mm}^2$ ($n = 9$ explants) pour les explants *Cdhr23*^{-/-} ($p = 1$), et de $1,90 \pm 0,54$ ($n = 27$ explants) pour les explants *Cdhr15*^{-/-} ($p > 0,4$ pour les comparaisons entre les sauvages et chaque mutant).

Analyses statistiques. Les données sont exprimées par leur moyenne + l'écart-type de la moyenne (SEM, pour *standard error of the mean*). Sans mention contraire, le nombre (n) dans les figures et le texte correspond au nombre de réplicats biologiques issus d'échantillons indépendants (individus). Les animaux de chaque groupe proviennent d'au moins deux portées indépendantes. Les immuno-marquages ont été réalisés au moins trois fois dans chaque cas. Les données ont été analysées avec Igor Pro (WaveMetrics), Prism (Graphpad), et l'outil en ligne BiostaTGV fondé sur le logiciel R (Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, INSERM, UPMC, Paris, France). Le test bilatéral non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer des groupes non appariés. Les proportions de souris ont été comparées par le test de χ^2 (avec la correction de Yates) ou le test exact de Fisher, en fonction de la taille de l'échantillon. La corrélation entre la disposition aux crises audiogènes et le nombre d'interneurones à parvalbumine dans les groupes $Cdhr23^{+/-}$ et $Cdhr15^{+/av-3J}$ a été réalisée avec le test de Mann-Whitney après ANOVA pour le facteur génétique. Les distributions de la position angulaire du centrosome ont été comparées avec le test de Kolmogorov-Smirnov. Les différences ont été considérées comme étant statistiquement significatives si $p < 0,05$. Les astérisques sur les graphes indiquent la la significativité statistique des différences (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; et ***, $p < 0,001$), et ns (pour *no significant*) indique une différence non statistiquement significative ($p > 0,05$).

Post-propos

Les interneurones corticaux ont été décrits à la fin du XIX^{ème} siècle dans les études de Santiago Ramón y Cajal^{85,86} et de Camillo Golgi⁸⁷ comme étant des neurones avec des axones courts, par opposition aux neurones pyramidaux et aux cellules étoilées épineuses. Au cours du XX^{ème} siècle, leurs caractéristiques morphologiques, électrophysiologiques et moléculaires ont été précisées (par exemple, en 1959 par Edward Gray⁵¹⁷ et en 2000 par Anirudh Gupta, Yun Wang et Henry Markram⁵¹⁸). **Il a en particulier été observé que les interneurones sont GABAergiques et la seule source de GABA dans le cortex par Charles Ribak en 1978 chez le rat⁵² et en 1981 par Anita Hendrickson, Stephen Hunt et Jang-Yen Wu chez le macaque⁵³**. La parvalbumine a été identifiée comme étant synthétisée par une majorité des interneurones chez les rongeurs en 1986 par Marco Celio⁶⁵.

En 1997, **Stewart Anderson, David Eisenstat, Limin Shi et John Rubenstein ont pour la première fois révélé que les interneurones naissent dans le subpallium puis migrent vers le cortex chez la souris⁴⁷** ; Hynek Wichterle *et al.* dans le laboratoire d'Arturo Alvarez-Buylla précisent en 1999 que ces neurones proviennent surtout de la MGE⁶². **En 2002, Kresimir Letinic, Roberto Zoncu et Pasko Rakic font la proposition d'une seconde source d'interneurones dans le cortex des primates³⁴⁵**. Les études qui ont suivi ont précisé l'origine des différentes populations d'interneurones et on décrit les premières molécules impliquées dans la migration tangentielle des neurones inhibiteurs, notamment l'implication de molécules répulsives comme slit (Yan Zhu *et al.* 1999, dans le laboratoire d'Yi Rhao)⁴⁹ et les sémaphorines, identifiées dans ce système en 2001 par Oscar Marín et Avraham Yaron *et al.* dans les laboratoires de John Rubenstein et Marc Tessier-Lavigne²¹⁹. Le développement des outils génétiques a permis de commencer à étudier les différents lignages issus des éminences ganglionnaires. Ainsi, en 2008, deux études identifient *Nkx2.1* comme étant un gène central dans le développement des interneurones issus de la MGE (Simon Butt *et al.*, dans le laboratoire de Gord Fishell ; Sandrina Nóbrega-Pereira *et al.*, dans le laboratoire d'Oscar Marín)^{114,220}. Ces études ont ouvert la voie à l'étude des facteurs impliqués dans la genèse des deux lignages d'interneurones de la MGE, synthétisant la parvalbumine ou la somatostatine, comme un gradient de *shh* (Qing Xu *et al.* 2010, dans le laboratoire de Stewart Anderson)¹⁴⁴.

Certains se sont penchés sur la migration tangentielle à l'échelle cellulaire, soit en étudiant le rôle intrinsèque dans la migration tangentielle de protéines exprimées dans les neuroblastes, comme *slc12a5* (Dante Bartone et Franck Polleux, 2009)²⁵⁶ ou *diaph1* (Ryota Shinohara *et al.* 2012, dans le laboratoire de Shuh Narumiya)²⁸¹, soit en s'intéressant au rôle ou à la dynamique de différents compartiments cellulaires (par exemple dans Mitsutoshi Yanagida *et al.* 2012, dans le laboratoire de Fujio Murakami²⁶⁹ ; Jean-Pierre Baudoin *et al.* 2012, dans le laboratoire de Christine Métin²⁷⁰). Peu d'études se sont concentrées pour l'instant sur le développement des interneurones aux stades précoces postnatals. Notons les études publiées par Derek Southwell *et al.* en 2012 sur l'apoptose des interneurones immatures dans le cortex murin pendant la première semaine postnatale³³² et par Mercedes Paredes *et al.* en 2016 dans le laboratoire d'Arturo Alvarez-Buylla montrant que des neuroblastes GABAergiques continuent à migrer chez l'humain après la naissance³⁵².

En 2011, Keith Brown *et al.*, dans le laboratoire de Song-Hai Shi¹⁵⁷, ont ouvert le débat sur la distribution des interneurones de même origine clonale dans le télencéphale, en proposant qu'ils occupent des aires néocorticales, voire des colonnes néocorticales communes. En 2013, Gabriele Ciceri *et al.*, dans le laboratoire d'Oscar Marín¹⁵⁹, ont des conclusions similaires. Des études contradictoires n'ont pas tardé à être publiées en 2015, suggérant qu'en réalité les interneurones clonaux se distribueraient de manière aléatoire dans le télencéphale (Christian Mayer *et al.*, dans le laboratoire de Gord Fishell ; Corey Harwell *et al.*, dans le laboratoire d'Arnold Kriegstein)^{160,162}, études suivies en 2016 de nouveaux échanges et nouvelles analyses de données précédemment publiées (Khadeejah Sultan *et al.*, dans le laboratoire de Song-Hai Shi ; Miguel Turrero Garcia *et al.*, dans le laboratoire de Corey Harwell ; Christian Mayer *et al.*, dans le laboratoire de Gord Fishell)^{158,161,164}. La question porte maintenant sur la pertinence biologique de considérer une colonne néocorticale ou une aire néocorticale concernant la distribution non aléatoire des interneurones clonaux.

Mon travail de thèse⁴¹², d'abord dans la continuité des études sur les gènes de surdité, nous a conduits sur le terrain de recherche du développement des interneurones et sur ces questions non complètement résolues des aspects cellulaires et moléculaires liés à leur migration ainsi qu'à l'existence possible de population d'interneurones spécifiques d'aires néocorticales.

Article de thèse

« *Auditory cortex interneuron development
requires cadherins operating hair-cell
mechanoelectrical transduction* »

version acceptée par le 13 juin 2017 aux

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

(PNAS)

Auteurs : **Baptiste Libé-Philippot**, Vincent Michel, Jacques Boutet de Monvel, Sébastien Le Gal, Typhaine Dupont, Paul Avan, Christine Métin, Nicolas Michalski et Christine Petit

1 Classification : Biological sciences/ Neuroscience

2

3 **Auditory cortex interneuron development**
4 **requires cadherins operating**
5 **hair-cell mechanoelectrical transduction**

6

7 Short title: Developing auditory cortex and tip-link cadherins

8

9 Baptiste Libé-Philippot^{1,2,3}, Vincent Michel^{1,2,3}, Jacques Boutet de Monvel^{1,2,3}, Sébastien Le Gal^{1,2,3},
10 Typhaine Dupont^{1,2,3}, Paul Avan^{4,5,6}, Christine Métin^{7,8,9,*}, Nicolas Michalski^{1,2,3,*} and Christine
11 Petit^{1,2,3,10,11,*,#}.

12 ¹Unité de Génétique et Physiologie de l'Audition, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

13 ²UMRS 1120, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), 75015 Paris,
14 France

15 ³Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, Complexité du Vivant, 75005 Paris, France

16 ⁴Laboratoire de Biophysique Sensorielle, Université d'Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand,
17 France

18 ⁵UMR 1107, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM),
19 63000 Clermont-Ferrand, France

20 ⁶Centre Jean Perrin, 63000 Clermont-Ferrand, France

21 ⁷Institut du Fer à Moulin, 75005 Paris, France

22 ⁸UMRS 839, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), 75005 Paris,
23 France

24 ⁹Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, Cerveau-Cognition-Comportement (ED3C),
25 75005 Paris, France

26 ¹⁰Syndrome de Usher et Autres Atteintes Rétino-Cochléaires, Institut de la Vision, 75012 Paris,
27 France

28 ¹¹Collège de France, 75005 Paris, France

29 * Joint senior authors

30 #Correspondence: christine.petit@pasteur.fr

31

32 **Keywords:** cadherins, tip links, ankle links, parvalbumin interneurons, audiogenic seizures, neuronal
33 migration, medial ganglionic eminence, auditory cortex, cell polarity, adhesion code, deafness

34

35 **Abstract**

36 Many genetic forms of congenital deafness affect the sound reception antenna of cochlear
37 sensory cells, the hair bundle. The resulting sensory deprivation jeopardizes auditory cortex (AC)
38 maturation. Early prosthetic intervention should revive this process. Nevertheless, this view assumes
39 that no intrinsic AC deficits coexist with the cochlear ones, a possibility as yet unexplored. We show
40 here that many γ -aminobutyric acid (GABA)ergic interneuron precursors, from their generation in the
41 medial ganglionic eminence up to their settlement in the AC, express two cadherin-related (cdhr)
42 proteins, *cdhr23* and *cdhr15*, that form the hair bundle tip-links gating the mechano-electrical
43 transduction channels. Mutant mice lacking either protein showed a major decrease in the number of
44 parvalbumin interneurons specifically in the AC, and displayed audiogenic reflex seizures. *Cdhr15*-
45 and *Cdhr23*-expressing interneuron precursors in *Cdhr23*^{-/-} and *Cdhr15*^{-/-} mouse embryos,
46 respectively, failed to enter the embryonic cortex and were scattered throughout the subpallium,
47 consistent with the cell polarity abnormalities we observed *in vitro*. In the absence of adhesion G
48 protein-coupled receptor V1 (*adgrv1*), another hair bundle link protein, the entry of *Cdhr23*- and
49 *Cdhr15*-expressing interneuron precursors into the embryonic cortex was also impaired. Our results
50 demonstrate that a population of newborn interneurons is endowed with specific cdhr proteins,
51 necessary for these cells to reach the developing AC. We suggest that an “early adhesion code”
52 targets populations of interneuron precursors to restricted neocortical regions belonging to the same
53 functional area. These findings open up new perspectives for auditory rehabilitation and cortical
54 therapies in the patients.

55

56 **Significance statement**

57 In early-onset genetic forms of deafness, deficits of the auditory sensory organ are sufficient
58 to account for the hearing impairment. However, the possibility that intrinsic deficits of the auditory
59 cortex coexist with the peripheral deficits is still unexplored. We show, in rodents and primates, that
60 the cadherin-related proteins *cdhr23* and *cdhr15* are expressed by many interneuron precursors
61 targeted specifically to the auditory cortex. A deficiency of either protein results in the failure of
62 these interneuron precursors to enter the embryonic cortex and in abnormally small numbers of
63 parvalbumin interneurons in the auditory cortex only. These findings should lead to an improvement
64 of hearing rehabilitation strategies in patients and open up new genetic approaches for studying
65 auditory cortex development and function.

66

67 \body

68 **Introduction**

69 The study of inherited forms of deafness in humans has greatly advanced our understanding
70 of the molecular and cellular mechanisms underlying sound processing in the auditory sensory organ,
71 the cochlea (1). Most mouse models for these deafness forms faithfully reproduce the hearing deficits
72 observed in humans. Furthermore, most of the genetic forms of profound congenital deafness studied
73 to date can be accounted for by deficits of the cochlea. Many of these deafness forms result from
74 structural and functional abnormalities of the hair bundle (2), a tuft of microvillus-like apical
75 protrusions, the stereocilia, forming the mechanosensitive antenna of the sensory hair cells (Fig.
76 S1B).

77 Early auditory deprivation, such as that due to congenital profound deafness, has major
78 consequences for the maturation of the central auditory system, including the auditory cortex (AC).
79 AC maturation involves successive sensitive periods of cortical plasticity, in which several features,
80 such as the tonotopic organization (sound frequency map) of the AC (3) and the balance between
81 neuronal excitation and inhibition (4), are established under the influence of the acoustic environment
82 (5, 6). This neural plasticity is particularly prominent early in life, shortly after hearing onset, and is
83 jeopardized by the lack of auditory stimulation experienced by children with profound congenital
84 deafness. However, early prosthetic interventions, in which profoundly deaf children are fitted with
85 cochlear implants, restore AC maturation through electrical stimulation of the auditory nerve, as
86 indicated by studies in deaf kittens (7, 8).

87 Much attention has been focused on the impact of auditory deprivation on AC maturation.
88 However, the possibility that AC intrinsic deficits coexist with peripheral auditory deficits in some
89 genetic forms of deafness has not yet been explored despite the expected impact on rehabilitation in
90 the patients. Such associated central intrinsic deficits would probably be masked by the peripheral
91 deficits. Given the major role played by adhesion proteins in brain development, we addressed this

92 issue by studying mouse models for two genetic forms of profound congenital deafness resulting
93 from mutations of *CDHR23* and *CDHR15*, encoding two cadherin-related (cdhr) transmembrane
94 proteins, cdhr23 and cdhr15 (also known as cadherin-23 and protocadherin-15, respectively; Fig.
95 S1A-B). Within the hair bundle, cdhr23 and cdhr15, which have unusually long ectodomains (9, 10)
96 (Fig. S1A), interact through their two most amino-terminal cadherin repeats to form an overlapped,
97 antiparallel heterodimer (11). They form the tip links (12), fine filaments connecting the tip of a
98 stereocilium to the side of the adjacent taller stereocilium that convey sound-evoked mechanical
99 forces to the mechano-electrical transduction channels. They also form transient lateral links
100 connecting the stereocilia together, and some of the stereocilia with the kinocilium, during hair
101 bundle morphogenesis (13-15) (Fig. S1B). The absence of mechano-electrical transduction currents in
102 the cochlear hair cells is sufficient to account for the profound deafness of patients lacking either
103 cdhr23 or cdhr15 (12, 16). Our explorations of the expression of cdhr23 and cdhr15 during brain
104 development and of mouse mutants lacking either cdhr protein revealed that both proteins were
105 required for the development of GABAergic interneurons in the AC. The development of these
106 interneurons also required *adgrv1* (also known as *gpr98*, *vlgr1*, or *mass1*), which forms another type
107 of hair bundle links, the ankle links.

108

109 **Results**

110

111 ***Cdhr23* and *Cdhr15* are expressed in the MGE-derived interneurons of the developing auditory**
112 **cortex**

113 We first studied the expression profiles of *cdhr23* and *cdhr15* in the mouse embryonic
114 telencephalon at the end of corticogenesis, on embryonic day 18.5 (E18.5). Both proteins were
115 detected in the neocortex. Remarkably, immunostaining was restricted to the developing AC (Fig.
116 1A). The mammalian neocortex contains glutamatergic excitatory neurons (85% of all neocortical
117 neurons in rodents) and γ -aminobutyric acid (GABA)ergic inhibitory interneurons (17, 18). In E18.5
118 *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato* mice, immunostaining for *cdhr23* and *cdhr15* in the AC was limited to
119 tdTomato-labeled (tdTomato⁺) neurons, the GABAergic interneuron precursors that are derived from
120 the *Nkx2.1*-expressing progenitors of the medial ganglionic eminence (MGE) and the preoptic area of
121 the subpallium, the ventral part of the telencephalon (19) (Fig. 1B). About a third of AC tdTomato⁺
122 neurons were labeled by anti-*cdhr23* or anti-*cdhr15* antibodies ($30 \pm 3\%$; $n = 10$ embryos). Almost all
123 these neurons ($96 \pm 1\%$; $n = 5$ embryos on E18.5) stained for one *cdhr* protein were also stained for
124 the other (Fig. 1C). Immunostaining for *cdhr23* and *cdhr15* persisted in tdTomato⁺ interneurons on
125 P5 (Fig. 1D), but had disappeared by P7 (Fig. S2A).

126 We then examined the expression of *Cdhr23* and *Cdhr15* at earlier stages. Unlike
127 glutamatergic neurons, which are generated in the proliferative ventricular zone of the neocortex and
128 migrate radially to form the future six layers of the cortical plate, neocortical GABAergic
129 interneurons undergo a long migration from their place of birth. They first migrate tangentially within
130 the subpallium, then within the neocortex to reach their final destination, and finally migrate radially
131 to their ultimate cortical layer position (Figs. 1B, 2A) (20, 21). *Cdhr23* and *cdhr15* were first detected
132 in the telencephalon on E13.5, in newborn tdTomato⁺ interneuron precursors derived from the
133 ventral MGE mantle zone (Figs. 2A-C, S2B-C), but not in their MKI67-immunoreactive proliferating

134 progenitors (Fig. 2D) or in the caudal ganglionic eminence (Fig. S2D). Notably, almost all the
135 neurons of the ventral MGE mantle zone stained for one *cdhr* protein were also stained for the other
136 (Fig. 2E).

137

138 **Mutant mice deficient for *cdhr23* or *cdhr15* have abnormally small numbers of parvalbumin** 139 **interneurons in the auditory cortex**

140 We then investigated whether interneurons expressing parvalbumin (PV) or somatostatin
141 (SST) (22), the two GABAergic interneuron populations derived from *Nkx2.1*-expressing progenitors
142 (23, 24), were affected by the absence of *cdhr23* or *cdhr15*. Markedly fewer PV interneurons were
143 detected in the AC of three-week-old *Cdhr23*^{-/-} mice (2-fold fewer; $P = 0.008$) and *Cdhr15*^{av-3J/av-3J}
144 mice (4.2-fold fewer; $P = 0.004$) lacking *cdhr23* and *cdhr15*, respectively, than in the AC of their
145 wild-type littermates (Fig. 3A). By contrast, the numbers of AC SST interneurons were unchanged (P
146 = 0.14 and $P = 0.15$ in *Cdhr23*^{-/-} and *Cdhr15*^{av-3J/av-3J} mice, respectively; Fig. 3C). Despite the strong
147 reduction in the number of PV interneurons in the AC, the cortical thickness of the AC in wild-type
148 ($1007 \pm 31 \mu\text{m}$, $n = 8$ mice), *Cdhr23*^{-/-} ($955 \pm 32 \mu\text{m}$, $n = 8$ mice) and *Cdhr15*^{av-3J/av-3J} ($980 \pm 21 \mu\text{m}$,
149 $n = 8$ mice) mice, and the estimated surface of the AC per section in wild-type ($1.11 \pm 0.09 \text{ mm}^2$ per
150 section, $n = 5$ mice), *Cdhr23*^{-/-} ($1.16 \pm 0.08 \text{ mm}^2$ per section, $n = 5$ mice) and *Cdhr15*^{av-3J/av-3J} ($1.15 \pm$
151 0.06 mm^2 per section, $n = 5$ mice) mice, were similar ($P > 0.4$ for all comparisons).

152 We asked whether this major PV interneuron deficit resulted from the absence of cochlear
153 mechano-electrical transduction in *Cdhr23*^{-/-} and *Cdhr15*^{av-3J/av-3J} mice, by studying *Cdhr23*^{+/-} and
154 *Cdhr15*^{+/av-3J} heterozygous mice, which have no cochlear deficit (25) (Fig. S3A-B). At three to four
155 weeks of age, these mice also had fewer PV interneurons in the AC, with interindividual variation,
156 than wild-type mice (1.6-fold and 1.8-fold fewer, on average, respectively; $P < 10^{-3}$; Fig. 3B). PV
157 interneuron deficits are often implicated in seizure disorders (26). We therefore investigated the
158 susceptibility of *Cdhr23*^{+/-} and *Cdhr15*^{+/av-3J} mice to audiogenic seizures, reflex seizures triggered by

159 loud sounds (27). Audiogenic seizures were observed in a large proportion of *Cdhr23*^{+/-} (51%, *n* =
160 49) and *Cdhr15*^{+/av-3J} (38%, *n* = 50) mice, but not in their wild-type littermates (*n* = 40 and *n* = 36,
161 respectively; *P* < 10⁻⁴ for both comparisons). These seizures occurred only in mice with at least a 1.6-
162 fold decrease in the number of PV interneurons in the AC (*P* < 10⁻⁴ for both comparisons; Fig. 3B).
163 This susceptibility was not linked to the sex of the affected mice (10 of 20 females and 11 of 23
164 males for affected *Cdhr23*^{+/-} mice, *P* = 0.87; 6 of 20 females and 13 of 24 males for affected
165 *Cdhr15*^{+/av-3J} mice, *P* = 0.19) or that of the parent transmitting the mutation (14 of 25 and 10 of 18
166 offspring produced by *Cdhr23*^{+/-} mothers and fathers, respectively, *P* = 0.77; 6 of 15 and 13 of 29
167 offspring produced by *Cdhr15*^{+/av-3J} mothers and fathers, respectively, *P* = 0.98). In contrast, the
168 numbers of SST interneurons were normal in the AC of *Cdhr23*^{+/-} and *Cdhr15*^{+/av-3J} mice (*P* = 0.91
169 and *P* = 0.85, respectively; Fig. 3C). Notably, the numbers of PV interneurons in the somatosensory
170 and motor cortices were unaffected in *Cdhr23*^{+/-} and *Cdhr15*^{+/av-3J} mice (*P* = 0.63, *P* = 1, *P* = 0.11, *P*
171 = 0.85 in the somatosensory cortex of *Cdhr23*^{+/-} and *Cdhr15*^{+/av-3J} mice and in the motor cortex of
172 *Cdhr23*^{+/-} and *Cdhr15*^{+/av-3J} mice, respectively; Fig. 3D-E). Thus, the absence of *cdhr23* or *cdhr15*
173 severely impairs the development of PV interneurons in the AC but not in other cortices.

174

175 **Mutant mice deficient for *cdhr23* or *cdhr15* in GABAergic interneurons have abnormally small** 176 **numbers of PV interneurons in the auditory cortex**

177 We looked for the origin of the PV interneuron deficit in *Cdhr23*^{-/-} and *Cdhr15*^{av-3J/av-3J} mice.
178 We used *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato* mice (19) to conditionally inactivate *Cdhr23* and *Cdhr15* in
179 MGE-derived interneuron precursors. *Nkx2.1* is transiently expressed by cortical interneuron
180 precursors of the MGE and preoptic area, which give rise to all the PV and SST interneurons of the
181 neocortex (19, 28). We crossed *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato* mice (19) with either *Cdhr23*^{lox/lox} mice
182 (29) or *Cdhr15*^{lox/lox} mice to obtain *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato; Cdhr23*^{lox/lox} mutant mice, or *Nkx2.1-*
183 *cre:Rosa-tdTomato; Cdhr15*^{lox/lox} mutant mice (hereafter referred to as *Cdhr23* cKO or *Cdhr15* cKO

184 mice). *Cdhr23*^{lox/lox} or *Cdhr15*^{lox/lox} littermates that do not express *cre*, or *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato*
185 mice, were used as controls. On P27, audiogenic seizures were detected in 87% of *Cdhr23* cKO mice
186 (n = 18) and 73% of *Cdhr15* cKO mice (n = 15), but in none of their control littermates ($P < 10^{-5}$ and
187 $P < 10^{-3}$ for *Cdhr23* cKO and *Cdhr15* cKO mice, respectively). Markedly fewer PV interneurons
188 were detected in the AC of P27 *Cdhr23* cKO (2.3-fold fewer; $P = 0.008$) and *Cdhr15* cKO mice (2.4-
189 fold fewer; $P = 0.008$) than in *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato* mice (Figs. 4A-B, S4). In contrast, the
190 numbers of SST interneurons in the AC were normal in *Cdhr23* cKO ($P = 0.69$) and *Cdhr15* cKO
191 mice ($P = 0.22$; Fig. 4A-B). The numbers of tdTomato+ interneurons, in which PV or SST were not
192 detected, were unchanged in *Cdhr23* cKO ($P = 0.42$) and *Cdhr15* cKO mice ($P = 0.15$; Fig. 4A-B),
193 which excludes the possibility that a mere loss of PV expression without loss of interneurons could
194 account for the abnormally small number of PV interneurons. This demonstrates that the deficit of
195 PV interneurons in the AC results from the lack of expression of *Cdhr23* or *Cdhr15* in MGE-derived
196 interneuron precursors.

197

198 **Loss of PV interneurons upon *in situ* deletion of *Cdhr15* in the temporal cortex of newborn mice**

199 We then assessed the role of *cdhr23* and *cdhr15* at early postnatal stages, by studying the
200 impact of a postnatal *in situ* deletion of *Cdhr15* in the temporal cortex. A lentiviral vector encoding a
201 cre recombinase fused to the green fluorescent protein (*LV-cre-GFP*) was injected into the temporal
202 cortex of *Cdhr15*^{lox/lox} mice on P1 (*LV-cre-GFP* P1-injected *Cdhr15*^{lox/lox} mice), when immature
203 neurons begin to form synapses (30). *Cdhr15* and *cdhr23* were no longer detected in the AC of these
204 mice on P5 (Fig. 5A). Moreover, in these mice, but not in *LV-cre-GFP* P1-injected wild-type mice,
205 many AC neurons stained for both GFP and the GABAergic interneuron marker *Dlx5* (31),
206 expressed, mostly in layer IV, caspase-3, a protein involved in cell apoptosis (Fig. S5B). On P24,
207 audiogenic seizures were observed in all *LV-cre-GFP* P1-injected *Cdhr15*^{lox/lox} mice ($n = 12$), but not
208 in *LV-cre-GFP* P1-injected wild-type mice ($n = 7$; $P < 10^{-4}$) or other controls including non-injected

209 *Cdhr15*^{lox/lox} mice ($n = 8$, $P < 10^{-4}$), LV-*GFP* P1-injected *Cdhr15*^{lox/lox} mice ($n = 4$, $P < 10^{-3}$), and
210 *Cdhr15*^{lox/lox} mice receiving LV-*cre-GFP* injection into the temporal cortex on P10 ($n = 8$, $P < 10^{-4}$) or
211 into the motor cortex on P1 ($n = 9$, $P < 10^{-4}$). LV-*cre-GFP* P1-injected *Cdhr15*^{lox/lox} mice that
212 received injection in the temporal cortex had markedly fewer PV interneurons in the AC (2.6-fold
213 fewer) than LV-*cre-GFP* P1-injected wild-type mice ($n = 6$ for both genotypes; $P = 0.004$; Fig. 5B-
214 C), with unaffected ABR thresholds (Fig. S5A). Thus, PV interneuron deficits restricted to the AC
215 can cause audiogenic seizures. Moreover, these results demonstrate the crucial role of *cdhr15* in the
216 survival of immature interneurons of the AC that give rise to PV interneurons.

217

218 **A population of interneuron precursors requires both *cdhr23* and *cdhr15* to enter the** 219 **embryonic cortex**

220 We then investigated a possible role of *cdhr23* and *cdhr15* in the early development of cortical
221 interneurons. On E14.5-E15.5, in *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato* embryos, tdTomato⁺ interneuron
222 precursors expressing *Cdhr23* (*cdhr23*⁺) and/or *Cdhr15* (*cdhr15*⁺) were detected within the
223 subpallium and along the superficial and deep tangential migratory routes of interneurons in the
224 developing cortex (23) (Figs. 6A, S1C, S7A). In contrast to the postnatal *in situ* deletion of *Cdhr15*
225 that led to the lack of expression of *Cdhr23* in the developing AC, interneuron precursors of
226 *Cdhr23*^{-/-} and *Cdhr15*^{-/-} embryos each retained the expression of *cdhr15* and *cdhr23*, respectively.
227 Remarkably, on E14.5, *cdhr15*⁺ and *cdhr23*⁺ neurons in *Cdhr23*^{-/-} and *Cdhr15*^{-/-} embryos,
228 respectively, were abnormally scattered throughout the subpallium (Fig. 6B), with no signs of
229 apoptosis (Fig. S6A). They were absent from the embryonic cortex, whereas the streams of
230 tangentially migrating neurons stained for doublecortin appeared unaffected (Fig. S6B). The
231 fluorescence ratio between *cdhr* signals in the embryonic cortex and subpallium was much lower in
232 *Cdhr23*^{-/-} (0.07 ± 0.04 , $n = 5$) and *Cdhr15*^{-/-} (0.17 ± 0.05 , $n = 5$) embryos than in wild-type embryos

233 (1.2 ± 0.07, $n = 7$; $P = 0.003$ for both comparisons). Thus, both *cdhr23* and *cdhr15* play crucial roles
234 in the migration of MGE-derived interneuron precursors towards the embryonic cortex.

235

236 **Cell polarity defects in *Cdhr23*^{-/-} and *Cdhr15*^{-/-} MGE-derived interneuron precursors**

237 We therefore explored whether the absence of *cdhr23* or *cdhr15* affected the migration of
238 MGE-derived interneuron precursors on synthetic substrates *in vitro*. *Cdhr15*⁺ or *cdhr23*⁺ neurons
239 leaving E13.5 *Cdhr23*^{-/-} or *Cdhr15*^{-/-} MGE explants, respectively, cultured on a laminin substrate,
240 migrated over much smaller areas (2.4-fold and 6.7-fold smaller, respectively) than *cdhr23*⁺/*cdhr15*⁺
241 neurons leaving wild-type MGE explants ($P < 10^{-2}$ for both comparisons; Fig. S7B). By contrast, the
242 migration area was unaffected by culturing MGE explants on a cadherin-2 (*cdh2*, N-
243 cadherin)/laminin substrate stimulating neurite outgrowth *in vitro* (32) (see Methods; $P > 0.4$ for both
244 comparisons; Fig. S7C). Both *cdhr23* and *cdhr15* were localized at the leading processes and growth
245 cones (Figs. 6C, S7D-E). They were coexpressed in 87% of the neurons leaving E13.5 wild-type
246 MGE explants that express *cdhr23* and/or *cdhr15* ($n = 108$ neurons). The percentage of neurons with
247 more than one process was three times greater in *cdhr15*⁺ neurons leaving *Cdhr23*^{-/-} explants (18%, n
248 = 131 neurons; $P = 0.004$) than in *cdhr23*⁺/*cdhr15*⁺ neurons leaving wild-type explants (6%, $n = 113$
249 neurons), but was unaffected in *cdhr23*⁺ neurons leaving *Cdhr15*^{-/-} explants ($n = 118$ neurons; $P =$
250 0.74; Fig. 6C). In *cdhr23*⁺ neurons migrating from *Cdhr15*^{-/-} explants, however, the centrosome was
251 randomly distributed around the nucleus rather than preferentially facing the leading process as in
252 *cdhr23*⁺/*cdhr15*⁺ neurons migrating from wild-type explants (Kolmogorov-Smirnov test, $P < 10^{-3}$;
253 Fig. 6C) and *cdhr15*⁺ neurons migrating from *Cdhr23*^{-/-} explants (Kolmogorov-Smirnov test, $P =$
254 0.95). These cell polarity deficits of newborn interneurons are consistent with the *in vivo* misrouting
255 of interneuron precursors (32) in *Cdhr23*^{-/-} and *Cdhr15*^{-/-} embryos (Fig. 6B). They suggest that both
256 *cdhr23* and *cdhr15* contribute to interneuron precursor cell polarity, but through different activities.

257

258 **Impaired entry of MGE-derived GABAergic interneurons expressing cdhr23 and cdhr15 into**
259 **the embryonic cortex of mutant mice lacking adgrv1**

260 We then asked whether the hair bundle of auditory hair cells and the interneurons of the
261 auditory cortex share other critical proteins for their respective development. Based on the
262 susceptibility to audiogenic seizures of *Adgrv1*^{-/-} mice, which have a moderate hearing impairment on
263 P20-P30 (33-35), we focused on adgrv1, a member of the adhesion G-protein-coupled receptor
264 family with a very long extracellular region that forms transient lateral links between stereocilia, the
265 ankle links, during hair bundle development (36, 37) (Fig. S1A-B). On P24, audiogenic seizures were
266 observed in all *Adgrv1*^{-/-} mice ($n = 36$), but none of the *Adgrv1*^{+/-} mice ($n = 21$; $P < 10^{-13}$). *Adgrv1*^{-/-}
267 mice also had fewer PV interneurons in the AC than their *Adgrv1*^{+/-} littermates (3.1-fold fewer, $n = 5$
268 for both genotypes, $P = 0.008$; Fig. 7A), but normal numbers of AC SST interneurons ($P = 0.2$; Fig.
269 7B).

270 In E13.5-E14.5 mice, adgrv1 was detected in the subpallium, including the mantle zone of the
271 MGE and the MGE ventricular zone containing MKI67-labeled progenitors (Figs. 7C, S8A). On
272 E18.5, adgrv1 was mostly detected in the nestin-labeled processes of radial glial cells in the AC (Fig.
273 S8B). In E14.5 *Adgrv1*^{-/-} mice, the entry of neurons expressing cdhr23 and cdhr15 into the embryonic
274 cortex was impaired (Fig. 7D). The fluorescence ratio between cdhr-immunoreactive signals in the
275 embryonic cortex and subpallium was 34% lower in *Adgrv1*^{-/-} embryos (0.8 ± 0.04 , $n = 7$) than in
276 wild-type embryos (1.2 ± 0.07 , $n = 7$, $P < 10^{-3}$). Thus, adgrv1 is also involved in the development of
277 PV interneurons in the AC, and in the entry of cdhr23- and cdhr15-expressing interneuron precursors
278 into the embryonic cortex.

279

280 **Similar expression profiles of cdhr23, cdhr15, and adgrv1 in mouse and macaque**

281 Finally, we addressed the issue of the conservation of expression profiles for cdhr23, cdhr15,
282 and adgrv1 in primate embryos. In E63 macaque embryos (equivalent to E13-E14 mice (38)), the

283 three proteins were immunodetected in the MGE (Fig. 8A). On E85 (equivalent to E17-E18 in the
284 mouse) (38), *cdhr23* and *cdhr15* were detected in *Dlx5*-immunoreactive GABAergic interneuron
285 precursors of the AC (31) (Figs. 8B-C, S9), and *adgrv1* was detected in the nestin-labeled processes
286 of AC radial glial cells (Figs. 8B, 8D, S9). The expression profiles of *cdhr23*, *cdhr15*, and *adgrv1* in
287 the embryonic telencephalon are thus similar in mouse and macaque.

288

289

290 **Discussion**

291 Our results reveal that AC interneuron development is impaired in mutant mice defective for
292 *Cdhr23*, *Cdhr15*, or *Adgrv1*. The lack of *cdhr23*, *cdhr15*, or *adgrv1* in these mice affects the entry of
293 *Cdhr15*⁻, *Cdhr23*⁻ and *Cdhr23*⁻/*Cdhr15*-expressing interneuron precursors, respectively, into the
294 embryonic cortex, leading to a greatly decreased number of PV interneurons in the AC (Fig. S1).

295 The observed interneuron precursor migration deficits are not a consequence of the peripheral
296 auditory impairment present in *Cdhr23*^{-/-}, *Cdhr15*^{av-3J/av-3J}, and *Adgrv1*^{-/-} mice (12-14), because they
297 are detectable as early as E.14.5, long before the onset of hearing (~P12-P13 in mice). The
298 abnormally small number of PV interneurons in the AC and the susceptibility to audiogenic seizures
299 induced by the *in situ* deletion of *Cdhr15* in the temporal cortex on P1 revealed an additional intrinsic
300 role of *cdhr15* in the developing AC before the onset of hearing. Given the co-expression of *Cdhr23*
301 and *Cdhr15* in immature interneurons of the AC, and the lack of expression of *Cdhr23* on P5 after the
302 deletion of *Cdhr15*, *cdhr23* probably plays a similar role in the early postnatal AC. Finally, a cortical
303 origin for the PV interneuron deficit in the AC is further supported by the observation of a similar
304 defect in *Cdhr23*^{+/-} and *Cdhr15*^{+/av-3J} mice and in *Cdhr23* cKO and *Cdhr15* cKO mice, which have no
305 peripheral hearing deficit.

306 Converging lines of evidence indicate that the *Cdhr23*⁻ and *Cdhr15*-expressing interneuron
307 precursors of the MGE develop into PV interneurons of the AC. *Cdhr23*⁻ and *Cdhr15*-expressing
308 interneuron precursors are found in the ventral part of the MGE on E13.5, the time and place at
309 which future cortical PV interneurons are generated (39). From E13.5 to P7, labeling for *cdhr23* and
310 *cdhr15* is limited to MGE-derived interneuron precursors, which mature into PV and SST
311 interneurons. By P5, *Cdhr23*⁻ and *Cdhr15*-expressing interneuron precursors are mostly found
312 accumulated in cortical layer IV in the AC, the preferential location of PV interneurons (40). The
313 number of SST interneurons, the other subclass of MGE-derived interneurons, was not affected in
314 *Cdhr23*, *Cdhr15*, and *Adgrv1* mutant mice. Moreover, *Cdhr23* and *Cdhr15* expression in interneuron

315 precursors was found to be restricted to the developing AC on E18.5, like the decrease in the number
316 of PV interneurons in three-week-old *Cdhr23* and *Cdhr15* mutant mice. Finally, the conditional
317 deletion of *Cdhr23* and *Cdhr15* in MGE-derived interneurons at the progenitor stage reproduced the
318 PV interneuron deficit and led to a susceptibility to audiogenic seizures. Together, these results
319 demonstrate that the population of *Cdhr23*- and *Cdhr15*-expressing interneuron precursors of the
320 MGE gives rise to a large fraction of the PV interneurons in the AC.

321 The numbers of PV interneurons in the AC of *Cdhr23*^{+/-} and *Cdhr15*^{+/av-3J} mice, although
322 systematically small, differed strongly between individual mice, as did susceptibility to audiogenic
323 seizures. The origin of this heterogeneity remains unclear, but was not related to the sex of the
324 affected heterozygous mouse or of the parent transmitting the mutation (which would have suggested
325 genomic imprinting of *Cdhr23* and *Cdhr15*). Genetic background or a random monoallelic
326 expression of *Cdhr23* and *Cdhr15* in the telencephalon (already reported for both genes in neural
327 progenitor cells derived from mouse embryonic stem cells (41)), may account for this variability.

328 What roles do *cdhr23* and *cdhr15* play in interneuron precursors? Migration areas were
329 markedly smaller for *cdhr15*⁺ interneuron precursors and *cdhr23*⁺ interneuron precursors growing out
330 of *Cdhr23*^{-/-} and *Cdhr15*^{-/-} MGE explants cultured on laminin substrate, respectively, than for
331 *cdhr23*⁺/*cdhr15*⁺ interneuron precursors growing out of wild-type MGE explants, suggesting a
332 motility deficit and/or a polarity defect of these migrating neurons. The migration areas observed on
333 a substrate consisting of *cdh2* and laminin, promoting the motility of interneuron precursors, were no
334 smaller than normal, but neurons lacking either *cdhr23* or *cdhr15* displayed cell polarity defects,
335 albeit with different manifestations. These cell polarity defects are consistent with the dispersion of
336 these interneuron precursors in the subpallium of mutant embryos. On P1, a developmental time-
337 point at which interneuron precursors have reached their final AC destination, the *in situ* deletion of
338 *Cdhr15* in the temporal cortex led to apoptosis of local interneuron precursors. This additional role of
339 *cdhr15* may reflect the early involvement of this *cdhr* in GABAergic interneuron synaptogenesis,

340 which is considered to be essential for interneuron survival (42). This dual role is reminiscent of that
341 reported for two other adhesion proteins in GABAergic interneuron precursors in the embryonic
342 telencephalon: *celsr3* (also known as *adgrc3*) (43) from the flamingo cadherin (9) and adhesion G-
343 protein coupled receptor families (44), and *cdh2* (32). However, these two proteins are not required
344 for the specific targeting of interneuron precursors to a particular neocortical area. *Cdh2* is critically
345 involved in the cell polarity and migration of GABAergic interneuron precursors, whereas *celsr3* is
346 required for the entry of interneuron precursors expressing calbindin-2 (also known as calretinin) into
347 the embryonic cortex, and both proteins are also involved in synaptogenesis (45, 46).

348 Previous studies have shown that most clonally related interneurons derived from the MGE
349 are targeted to one telencephalon structure (47-49), where they form clusters (50, 51). Regardless of
350 the possible clonal relationship between *Cdhr23-/Cdhr15*-expressing GABAergic interneuron
351 precursors in the AC, our results indicate that these precursors are targeted specifically to the AC
352 immediately after their birth. Based on the critical role of adhesion proteins *cdhr23* and *cdhr15* in the
353 targeting and survival of newly born GABAergic interneuron precursors in a specific cortical area,
354 the developing AC, reported here for the first time, we suggest that there is an “adhesion code”,
355 which functions early in development and targets particular populations of newborn MGE-derived
356 GABAergic interneuron precursors to functionally specific areas of the neocortex.

357 The conservation, from mouse to macaque, of the expression profiles of the three proteins
358 studied here suggests the existence of an intrinsic deficit of PV interneurons in the AC of humans
359 carrying *CDHR23*, *CDHR15*, or *ADGRV1* mutations, despite differences in the origin of these
360 neurons in the human brain (52). After the fitting of cochlear implants, some of these patients have
361 been reported to face unusual speech-recognition difficulties not observed in patients with mutations
362 of other deafness genes (53). These difficulties might be related to the involvement of PV
363 interneurons in the experience-driven neural plasticity underlying AC maturation (8, 54) and the
364 temporal precision of sound detection critical for speech perception (55). The shaping of the

365 perception of several acoustic features throughout life, including frequency discrimination acuity (56)
366 and the detection of unexpected sounds, also involves PV interneurons of the AC (57).

367 The results presented here suggest the possible involvement of other deafness genes
368 underlying peripheral auditory deficits in the development and functioning of the AC. Mutations of
369 *CDHR23* or *CDHR15*, and of *ADGRV1* are responsible for type 1 and type 2 Usher syndrome,
370 respectively. These autosomal recessive disorders combine congenital hearing impairment with
371 delayed-onset sight loss. The formation of protein complexes containing *cdhr23*, *cdhr15*, or *adgrv1*
372 together with other Usher syndrome gene products in both hair cells and photoreceptor cells (58-60)
373 identifies these proteins as attractive candidates for involvement in AC interneuron development.
374 Broadening our view by identifying the other proteins involved will help to clarify the evolutionary
375 steps accounting for the use of the same essential proteins for the development of the cochlea and the
376 auditory cortex.

377 The impact of sensory deprivation on AC development in people with genetic forms of
378 deafness has so far overshadowed the consideration of possible intrinsic cortical deficiencies.
379 Advances in our understanding of the hidden intrinsic cortical deficits of hereditary forms of deafness
380 should provide a scientific basis for improving auditory rehabilitation in patients and for the
381 development of cortical therapies. This work should also pave the way to the development of a
382 genetic approach to the cellular and molecular mechanisms involved in AC development and
383 functioning.

384

385

386 **Materials and methods**

387 A detailed description of the methods is available in SI Appendix, Materials and Methods. Animal
388 experiments were carried out in accordance with French and European regulations. Approval for the
389 experiments using animals was obtained from the Animal Use Committee of Institut Pasteur.
390 Susceptibility to audiogenic seizures was evaluated using high-intensity (100-110 dB) continuous
391 pure tones (8-15 kHz) lasting up to one minute. Hearing tests were performed as described in (61,
392 62). For immunofluorescence analyses, the antibodies directed against cdhr23 and cdhr15 were used
393 as described in (16, 59). Culture of MGE explants and quantification of neuronal migration were
394 carried out as described in (32).

395

396 **Acknowledgments**

397 We thank M. Bosch Grau, S. Chardenoux, A. Emptoz, C. Leclech, D. Oficjalska, M. Pedraza Boti, E.
398 Pepermans, C. Trébeau, and D. Weil for assistance with this project, and J.-P. Hardelin for his
399 important contribution to the writing of the manuscript. We warmly thank S. Etienne-Manneville
400 (Institut Pasteur, Paris, France) and S. Garel (Ecole Normale Supérieure, Paris, France) for advice.
401 We thank G. Lepousez (Institut Pasteur, Paris, France) and N. Renier (Institut du Cerveau et de la
402 Moelle Epinière, Paris, France) for critical reading of the manuscript. We thank C. Dehay
403 (PrimaLyon Platform, Institut Cellule Souche et Cerveau, INSERM, Bron, France), N. Kessarlis
404 (University College London, United Kingdom), and M. Sato (University of Fukui, Japan) for sharing
405 brain sections from macaque embryos, *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato* mice, and *Adgrv1^{tm1Msat}* mice,
406 respectively. We gratefully acknowledge the Imagopole-Citech facility (Institut Pasteur, Paris,
407 France), which is part of the France BioImaging infrastructure supported by the French National
408 Research Agency (ANR-10-INSB-04-01, *Investissements d'Avenir* program), for the use of their
409 microscopes. This work was supported by PhD funding for BLP from the French Ministry of
410 Research, attributed by the Ecole Normale Supérieure (Paris, France), the *Prix Emergence* and the

411 SEIZEAR grant of the *Agir Pour l'Audition* foundation to NM, and grants from the French Agence
412 Nationale pour la Recherche (ANR) as part of the second *Investissements d'Avenir* program
413 LIGHT4DEAF [ANR-15-RHUS-0001] and the LabEx LIFESENSES [ANR-10-LABX-65], the
414 European Research Council (ERC-2011-ADG_294570) to CP, the BNP Paribas Foundation, the
415 FAUN Stiftung and the LHW-Stiftung.

416

417 **Author contributions**

418 CP, NM, and CM designed the study; BLP, VM, JBM, PA, SLG and TD performed research; BLP,
419 JBM, CM, NM, and CP analyzed data; CP, NM, CM and BLP wrote the paper.

420

421

422 **References**

- 423 1. Petit C (1996) Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand.
 424 *Nat Genet* 14(4):385-391.
- 425 2. Richardson GP, de Monvel JB, & Petit C (2011) How the genetics of deafness illuminates
 426 auditory physiology. *Annu Rev Physiol* 73:311-334.
- 427 3. Zhang LI, Bao S, & Merzenich MM (2001) Persistent and specific influences of early
 428 acoustic environments on primary auditory cortex. *Nat Neurosci* 4(11):1123-1130.
- 429 4. Dorrn AL, Yuan K, Barker AJ, Schreiner CE, & Froemke RC (2010) Developmental sensory
 430 experience balances cortical excitation and inhibition. *Nature* 465(7300):932-936.
- 431 5. de Villers-Sidani E & Merzenich MM (2011) Lifelong plasticity in the rat auditory cortex:
 432 basic mechanisms and role of sensory experience. *Prog Brain Res* 191:119-131.
- 433 6. Sanes DH & Bao S (2009) Tuning up the developing auditory CNS. *Curr Opin Neurobiol*
 434 19(2):188-199.
- 435 7. Klinke R, Kral A, Heid S, Tillein J, & Hartmann R (1999) Recruitment of the auditory cortex
 436 in congenitally deaf cats by long-term cochlear electrostimulation. *Science* 285(5434):1729-
 437 1733.
- 438 8. Kral A, Kronenberger WG, Pisoni DB, & O'Donoghue GM (2016) Neurocognitive factors in
 439 sensory restoration of early deafness: a connectome model. *Lancet Neurol*.
- 440 9. Hulpiau P, Gul IS, & van Roy F (2013) New insights into the evolution of metazoan
 441 cadherins and catenins. *Prog Mol Biol Transl Sci* 116:71-94.
- 442 10. Hulpiau P & van Roy F (2009) Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int J*
 443 *Biochem Cell Biol* 41(2):349-369.
- 444 11. Sotomayor M, Weihofen WA, Gaudet R, & Corey DP (2012) Structure of a force-conveying
 445 cadherin bond essential for inner-ear mechanotransduction. *Nature* 492(7427):128-132.
- 446 12. Kazmierczak P, *et al.* (2007) Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link
 447 filaments in sensory hair cells. *Nature* 449(7158):87-91.
- 448 13. Lefevre G, *et al.* (2008) A core cochlear phenotype in USH1 mouse mutants implicates
 449 fibrous links of the hair bundle in its cohesion, orientation and differential growth.
 450 *Development* 135(8):1427-1437.
- 451 14. Petit C & Richardson GP (2009) Linking genes underlying deafness to hair-bundle
 452 development and function. *Nat Neurosci* 12(6):703-710.
- 453 15. Goodyear RJ, Forge A, Legan PK, & Richardson GP (2010) Asymmetric distribution of
 454 cadherin 23 and protocadherin 15 in the kinocilial links of avian sensory hair cells. *J Comp*
 455 *Neurol* 518(21):4288-4297.
- 456 16. Pepermans E, *et al.* (2014) The CD2 isoform of protocadherin-15 is an essential component
 457 of the tip-link complex in mature auditory hair cells. *EMBO Mol Med* 6(7):984-992.
- 458 17. Defelipe J (2011) The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits, and
 459 intellectual creativity. *Front Neuroanat* 5:29.
- 460 18. Markram H, *et al.* (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci*
 461 5(10):793-807.
- 462 19. Kessaris N, *et al.* (2006) Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal
 463 elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* 9(2):173-179.
- 464 20. Marin O & Muller U (2014) Lineage origins of GABAergic versus glutamatergic neurons in
 465 the neocortex. *Curr Opin Neurobiol* 26:132-141.
- 466 21. Faux C, Rakic S, Andrews W, & Britto JM (2012) Neurons on the move: migration and
 467 lamination of cortical interneurons. *Neurosignals* 20(3):168-189.
- 468 22. Rudy B, Fishell G, Lee S, & Hjerling-Leffler J (2011) Three groups of interneurons account
 469 for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol* 71(1):45-61.

- 470 23. Marin O (2013) Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical
471 interneurons. *Eur J Neurosci* 38(1):2019-2029.
- 472 24. Xu Q, Cobos I, De La Cruz E, Rubenstein JL, & Anderson SA (2004) Origins of cortical
473 interneuron subtypes. *J Neurosci* 24(11):2612-2622.
- 474 25. Zheng QY, *et al.* (2005) Digenic inheritance of deafness caused by mutations in genes
475 encoding cadherin 23 and protocadherin 15 in mice and humans. *Hum Mol Genet* 14(1):103-
476 111.
- 477 26. Houser CR (2014) Do structural changes in GABA neurons give rise to the epileptic state?
478 *Adv Exp Med Biol* 813:151-160.
- 479 27. Italiano D, *et al.* (2016) Genetics of reflex seizures and epilepsies in humans and animals.
480 *Epilepsy Res* 121:47-54.
- 481 28. Nobrega-Pereira S, *et al.* (2008) Postmitotic Nkx2-1 controls the migration of telencephalic
482 interneurons by direct repression of guidance receptors. *Neuron* 59(5):733-745.
- 483 29. Etournay R, *et al.* (2010) Cochlear outer hair cells undergo an apical circumference
484 remodeling constrained by the hair bundle shape. *Development* 137(8):1373-1383.
- 485 30. Le Magueresse C & Monyer H (2013) GABAergic interneurons shape the functional
486 maturation of the cortex. *Neuron* 77(3):388-405.
- 487 31. Eisenstat DD, *et al.* (1999) DLX-1, DLX-2, and DLX-5 expression define distinct stages of
488 basal forebrain differentiation. *J Comp Neurol* 414(2):217-237.
- 489 32. Luccardini C, *et al.* (2013) N-cadherin sustains motility and polarity of future cortical
490 interneurons during tangential migration. *J Neurosci* 33(46):18149-18160.
- 491 33. Frings H & Frings M (1951) Otitis media and audiogenic seizures in mice. *Science*
492 113(2946):689-690.
- 493 34. Yagi H, *et al.* (2005) Vlgr1 knockout mice show audiogenic seizure susceptibility. *J*
494 *Neurochem* 92(1):191-202.
- 495 35. Skradski SL, *et al.* (2001) A novel gene causing a mendelian audiogenic mouse epilepsy.
496 *Neuron* 31(4):537-544.
- 497 36. McGee J, *et al.* (2006) The very large G-protein-coupled receptor VLGR1: a component of
498 the ankle link complex required for the normal development of auditory hair bundles. *J*
499 *Neurosci* 26(24):6543-6553.
- 500 37. Michalski N, *et al.* (2007) Molecular characterization of the ankle-link complex in cochlear
501 hair cells and its role in the hair bundle functioning. *J Neurosci* 27(24):6478-6488.
- 502 38. Dehay C & Kennedy H (2007) Cell-cycle control and cortical development. *Nat Rev Neurosci*
503 8(6):438-450.
- 504 39. Sultan KT, Brown KN, & Shi SH (2013) Production and organization of neocortical
505 interneurons. *Front Cell Neurosci* 7:221.
- 506 40. Tremblay R, Lee S, & Rudy B (2016) GABAergic Interneurons in the Neocortex: From
507 Cellular Properties to Circuits. *Neuron* 91(2):260-292.
- 508 41. Gendrel AV, *et al.* (2014) Developmental dynamics and disease potential of random
509 monoallelic gene expression. *Dev Cell* 28(4):366-380.
- 510 42. Bartolini G, Ciceri G, & Marin O (2013) Integration of GABAergic interneurons into cortical
511 cell assemblies: lessons from embryos and adults. *Neuron* 79(5):849-864.
- 512 43. Ying G, *et al.* (2009) The protocadherin gene Celsr3 is required for interneuron migration in
513 the mouse forebrain. *Mol Cell Biol* 29(11):3045-3061.
- 514 44. Hamann J, *et al.* (2015) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIV.
515 Adhesion G protein-coupled receptors. *Pharmacol Rev* 67(2):338-367.
- 516 45. Arikath J & Reichardt LF (2008) Cadherins and catenins at synapses: roles in
517 synaptogenesis and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 31(9):487-494.
- 518 46. Thakar S, *et al.* (2017) Evidence for opposing roles of Celsr3 and Vangl2 in glutamatergic
519 synapse formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(4):E610-E618.

- 520 47. Mayer C, *et al.* (2015) Clonally Related Forebrain Interneurons Disperse Broadly across Both
521 Functional Areas and Structural Boundaries. *Neuron* 87(5):989-998.
- 522 48. Harwell CC, *et al.* (2015) Wide Dispersion and Diversity of Clonally Related Inhibitory
523 Interneurons. *Neuron* 87(5):999-1007.
- 524 49. Sultan KT, *et al.* (2016) Clonally Related GABAergic Interneurons Do Not Randomly
525 Disperse but Frequently Form Local Clusters in the Forebrain. *Neuron* 92(1):31-44.
- 526 50. Brown KN, *et al.* (2011) Clonal production and organization of inhibitory interneurons in the
527 neocortex. *Science* 334(6055):480-486.
- 528 51. Ciceri G, *et al.* (2013) Lineage-specific laminar organization of cortical GABAergic
529 interneurons. *Nat Neurosci* 16(9):1199-1210.
- 530 52. Geschwind DH & Rakic P (2013) Cortical evolution: judge the brain by its cover. *Neuron*
531 80(3):633-647.
- 532 53. Wu CC, *et al.* (2015) Identifying Children With Poor Cochlear Implantation Outcomes Using
533 Massively Parallel Sequencing. *Medicine (Baltimore)* 94(27):e1073.
- 534 54. Kral A, Tillein J, Heid S, Klinke R, & Hartmann R (2006) Cochlear implants: cortical
535 plasticity in congenital deprivation. *Prog Brain Res* 157:283-313.
- 536 55. Weible AP, *et al.* (2014) Perceptual gap detection is mediated by gap termination responses in
537 auditory cortex. *Curr Biol* 24(13):1447-1455.
- 538 56. Aizenberg M, Mwilambwe-Tshilobo L, Briguglio JJ, Natan RG, & Geffen MN (2015)
539 Bidirectional Regulation of Innate and Learned Behaviors That Rely on Frequency
540 Discrimination by Cortical Inhibitory Neurons. *PLoS Biol* 13(12):e1002308.
- 541 57. Natan RG, *et al.* (2015) Complementary control of sensory adaptation by two types of cortical
542 interneurons. *Elife* 4.
- 543 58. Michalski N & Petit C (2015) Genetics of auditory mechano-electrical transduction. *Pflugers*
544 *Arch* 467(1):49-72.
- 545 59. Sahly I, *et al.* (2012) Localization of Usher 1 proteins to the photoreceptor calyceal processes,
546 which are absent from mice. *J Cell Biol* 199(2):381-399.
- 547 60. Schietroma C, *et al.* (2017) Usher syndrome type 1-associated cadherins shape the
548 photoreceptor outer segment. *J Cell Biol* 216(6):1849-1864.
- 549 61. Moller AR & Jannetta PJ (1983) Interpretation of brainstem auditory evoked potentials:
550 results from intracranial recordings in humans. *Scand Audiol* 12(2):125-133.
- 551 62. Avan P, Buki B, & Petit C (2013) Auditory distortions: origins and functions. *Physiol Rev*
552 93(4):1563-1619.
- 553 63. Yagi H, *et al.* (2007) V1gr1 is required for proper stereocilia maturation of cochlear hair cells.
554 *Genes Cells* 12(2):235-250.
- 555 64. Lallemand Y, Luria V, Haffner-Krausz R, & Lonai P (1998) Maternally expressed PGK-Cre
556 transgene as a tool for early and uniform activation of the Cre site-specific recombinase.
557 *Transgenic Res* 7(2):105-112.
- 558 65. Ross KC & Coleman JR (2000) Developmental and genetic audiogenic seizure models:
559 behavior and biological substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 24(6):639-653.
- 560 66. Gavrieli Y, Sherman Y, & Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in
561 situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119(3):493-501.
- 562 67. Paxinos G, Franklin KBJ, & Franklin KBJ (2001) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*
563 (Academic Press, San Diego) 2nd Ed.
- 564

565

566 **Figures**

567

568 **Figure 1. Expression of *Cdhr23* and *Cdhr15* in MGE-derived interneuron precursors in the**
569 **developing auditory cortex in mice**

570 (A) Horizontal (upper panel) and coronal (lower panel) sections through the developing auditory
571 cortex (AC) of wild-type E18.5 mouse embryos immunostained for *cdhr23* and *cdhr15*. (B) Diagram
572 of the migration routes of MGE-derived interneurons in the developing neocortex, and corresponding
573 coronal sections of the AC of a *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato* E18.5 mouse embryo immunostained for
574 tdTomato and *cdhr23* or *cdhr15*, with detailed views of tdTomato+ *cdhr23*+ or *cdhr15*+ interneurons
575 (lower panel). (C) Coronal section of the AC of a wild-type E18.5 mouse embryo immunostained for
576 *cdhr23* and *cdhr15*. (D) Coronal section of the AC of a *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato* P5 mouse
577 immunostained for tdTomato and *cdhr23* or *cdhr15*. Cell nuclei are stained in blue (DAPI).
578 Abbreviations: H, hippocampus; A/S/I/OC, auditory/somatosensory/insular/orbital cortex; E/VC,
579 entorhinal/visual cortex; (s)vz, (sub)ventricular zone; iz, intermediate zone; cp, cortical plate; mz,
580 marginal zone; IN, interneuron; p, posterior; l, lateral; m, medial; d, dorsal.

581

582 **Figure 2. Co-expression of *Cdhr23* and *Cdhr15* in MGE-derived postmitotic interneuron**
583 **precursors in mice**

584 (A) Diagram of the tangential migration routes of MGE-derived interneurons on a coronal section of
585 the mouse embryonic telencephalon on E13.5-E15.5. (B,C) Coronal basal telencephalon sections of a
586 *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato* E13.5 embryo immunostained for tdTomato and *cdhr23* (B) or *cdhr15*
587 (C), with detailed views of the MGE shown below. Note the expression of *cdhr23* and *cdhr15* in
588 tdTomato+ neurons of the striatum and globus pallidus. (D) Coronal section of the MGE of a wild-
589 type E13.5 embryo, immunostained for *cdhr23* and MKI67, a cell proliferation marker. (E) Detailed
590 view of the MGE of a wild-type E13.5 embryo immunostained for *cdhr23* and *cdhr15*.

591 Abbreviations: NCx, neocortex; L/MGE, lateral/medial ganglionic eminence; POA, preoptic area;
592 GP, globus pallidus; (s)vz, (sub)ventricular zone; iz, intermediate zone; cp, cortical plate; mz,
593 marginal zone; l, lateral; m, medial; d, dorsal.

594

595 **Figure 3. Abnormally small number of PV interneurons in the auditory cortex of mice with**
596 **mutations of *Cdhr23* or *Cdhr15***

597 (A, B) Density of PV interneuron cell bodies in the auditory cortex (AC) of wild-type, *Cdhr23*^{-/-} and
598 *Cdhr15*^{av-3J/av-3J} mice (A), and in the AC of *Cdhr23*^{+/-} and *Cdhr15*^{+/av-3J} mice with/without audiogenic
599 seizures (AS+/AS- mice) on P27 (B); Coronal sections (upper panel), and detailed views (lower
600 panel) are shown. Note that the remaining PV interneurons in *Cdhr23*^{-/-} and *Cdhr15*^{av-3J/av-3J} mice, and
601 in *Cdhr23*^{+/-} and *Cdhr15*^{+/av-3J} mice with audiogenic seizures have a lower-density dendritic
602 arborization than in wild-type mice. (C) Density of SST interneuron cell bodies in the AC of wild-
603 type, *Cdhr23*^{-/-} and *Cdhr15*^{av-3J/av-3J} mice, and in the AC of *Cdhr23*^{+/-} and *Cdhr15*^{+/av-3J} AS+/AS- mice
604 on P27; Coronal sections of the AC of wild-type, *Cdhr23*^{-/-}, and *Cdhr15*^{av-3J/av-3J} P27 mice
605 immunostained for PV and SST are shown. Note that the SST interneuron density was not linked to a
606 susceptibility to audiogenic seizures ($P = 0.22$). (D, E) Density of PV interneuron cell bodies in the
607 somatosensory (D) and motor cortices (E) of wild-type, *Cdhr23*^{+/-} mice, and *Cdhr15*^{+/av-3J} P27 mice;
608 Coronal sections of the wild-type mice and *Cdhr23*^{+/-} mice displaying audiogenic seizures
609 immunostained for PV and SST. Abbreviations: H, hippocampus; AS+/AS- mice, mice with/without
610 audiogenic seizures; d, dorsal; m, medial; l, lateral. Data are means \pm s.e.m, with individual values
611 (open circles). The number of mice analyzed for each genotype is indicated between brackets. **, $P <$
612 10^{-2} ; ns, not significant (non-parametric two-tailed Mann-Whitney tests).

613

614

615 **Figure 4. Abnormally small number of PV interneurons in the auditory cortex of mice with**
616 **conditional deletion of *Cdhr23* or *Cdhr15* in MGE-derived interneuron precursors**

617 (A) Coronal sections of the AC of *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato*, *Cdhr23* cKO, and *Cdhr15* cKO mice
618 on P27 immunostained for PV and tdTomato. (B) Bar graphs showing the density of cell bodies of
619 PV interneurons, SST interneurons, and tdTomato⁺ interneurons that do not express PV or SST, in
620 the AC of *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato*, *Cdhr23* cKO, and *Cdhr15* cKO mice on P27. Abbreviations: d,
621 dorsal; l, lateral. Data are means \pm s.e.m, with individual values (open circles). The number of mice
622 analyzed for each genotype is indicated between brackets. **, $P < 10^{-2}$; ns, not significant (non-
623 parametric two-tailed Mann-Whitney tests).

624

625 **Figure 5. *In situ* conditional deletion of *Cdhr15* in the AC of mice induces susceptibility to**
626 **audiogenic seizures and reduced number of PV interneurons**

627 (A) Coronal sections of the auditory cortex (AC) of wild-type and *Cdhr15*^{lox/lox} P5 mice injected on
628 P1 with the *LV-cre-GFP* recombinant virus, immunostained for *cdhr23* and *cdhr15*. The site of
629 injection is indicated on the diagram. (B) Detailed view of PV-immunoreactive interneurons in AC
630 coronal sections from *LV-cre-GFP* P1-injected wild-type and *Cdhr15*^{lox/lox} mice on P24. (C) Density
631 of PV interneuron cell bodies in mice tested for susceptibility to audiogenic seizures. Abbreviations:
632 AS+/AS- mice: mice with/without audiogenic seizures; d, dorsal; l, lateral. Data are individual values
633 (open circles). **, $P < 10^{-2}$ (non-parametric two-tailed Mann-Whitney test).

634

635 **Figure 6. Critical role of *Cdhr23* and *Cdhr15* in the migration of MGE-derived interneuron**
636 **precursors**

637 (A) Coronal section of the telencephalon in a *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato* E15.5 mouse embryo,
638 immunostained for tdTomato and *cdhr23*, and detailed view of the neocortex (lower panel). (B)
639 Coronal sections of the telencephalon in wild-type, *Cdhr23*^{-/-}, and *Cdhr15*^{-/-} E14.5 mouse embryos

640 immunostained for both cdhr23 and cdhr15, cdhr15, and cdhr23, respectively. (C) Representative
641 neurons migrating from MGE explants of a wild-type mouse, cultured on a cdh2/laminin substrate,
642 and immunostained for actin, cdhr23, and cdhr15 without permeabilization (left panel), or
643 immunostained for actin and the centrosome marker γ -tubulin (arrowheads) after permeabilization
644 (middle left panel). The histograms show the distribution of centrosome angular positions (see
645 diagram) in unipolar cells, and the chart indicates the number of processes (one, two, or three) of
646 cdhr15⁺ and cdhr23⁺ neurons derived from *Cdhr23*^{-/-} and *Cdhr15*^{-/-} MGE explants, cultured on
647 cdh2/laminin substrate, respectively (right panels). Abbreviations: NCx, neocortex; L/MGE,
648 lateral/medial ganglionic eminence; (s)vz, (sub)ventricular zone; iz, intermediate zone; cp, cortical
649 plate; mz, marginal zone; d, dorsal; m, medial; c, centrosome; gc, growth cone. **, $P < 10^{-2}$; ***, $P <$
650 10^{-3} ; ns, not significant (Kolmogorov-Smirnov tests for the centrosome angular position data, Chi
651 squared test for the cell polarity data).

652

653 **Figure 7. Defective development of MGE-derived cdhr23⁺/cdhr15⁺ GABAergic interneurons in**
654 ***Adgrv1*^{-/-} mice**

655 (A) Coronal sections of the auditory cortex (AC) of *Adgrv1*^{+/-} and *Adgrv1*^{-/-} P27 mice immunostained
656 for PV with detailed views (lower panels), and bar graph showing the density of PV interneuron cell
657 bodies. (B) Coronal section of the AC of an *Adgrv1*^{-/-} P27 mouse immunostained for PV and SST, and
658 bar graph showing the density of SST interneuron cell bodies in wild-type and *Adgrv1*^{-/-} mice. (C)
659 Coronal section of the telencephalon of a *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato* mouse embryo on E14.5,
660 immunostained for tdTomato and *adgrv1* and detailed view of the embryonic cortex (right panel). (D)
661 Coronal sections of the telencephalon of *Adgrv1*^{+/-} and *Adgrv1*^{-/-} mouse embryos on E14.5,
662 immunostained for cdhr23 and cdhr15. Abbreviations: NCx, neocortex; L/MGE, lateral/medial
663 ganglionic eminence; (s)vz, (sub)ventricular zone; iz, intermediate zone; cp, cortical plate; mz,
664 marginal zone; d, dorsal; m, medial; l: lateral. Data are means \pm s.e.m with individual values (open

665 circles). The number of mice analyzed for each genotype is indicated between brackets. **, $P < 10^{-2}$;
666 ns, not significant (non-parametric two-tailed Mann-Whitney tests).

667

668 **Figure 8. Expression of *Cdhr23*, *Cdhr15* and *Adgrv1* in the MGE and developing auditory**
669 **cortex of macaque embryos**

670 (A) Coronal sections of the telencephalon in an E63 macaque embryo, immunostained for *cdhr23*,
671 *cdhr15*, or *adgrv1*. The MGE mantle zone is indicated by an asterisk and the MGE ventricular zone
672 by an arrow. The different regions are shown on the diagram. (B) Sagittal sections of the developing
673 auditory cortex (AC) of an E85 macaque embryo immunostained for *Dlx5* and *cdhr23*, *cdhr15*, or
674 *adgrv1* showing the outer subventricular zone and the subplate (see diagram of the brain cortical
675 layers on the left side). (C, D) High-magnification views of GABAergic interneuron precursors in the
676 outer subventricular zone, immunostained for *Dlx5* and either *cdhr23* or *cdhr15* (C), and of a radial
677 glial cell immunostained for *adgrv1* and *nestin*, a radial glia marker (D). Abbreviations: (s)vz,
678 (sub)ventricular zone; i/o svz, inner/outer svz; iz, intermediate zone; sp, subplate; cp, cortical plate;
679 mz, marginal zone; d, dorsal; m, medial; l, lateral.

680

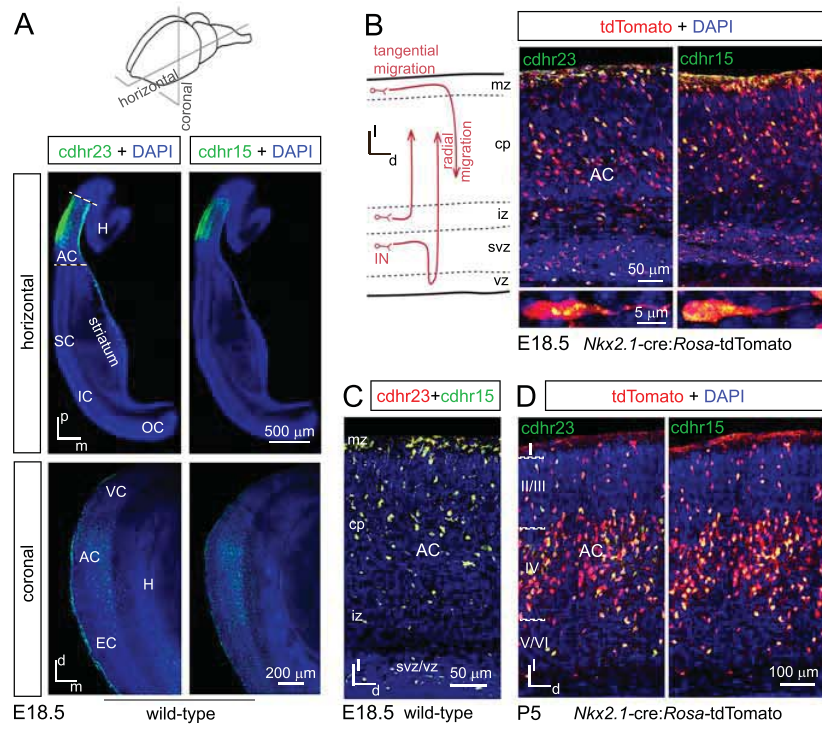


Figure 1

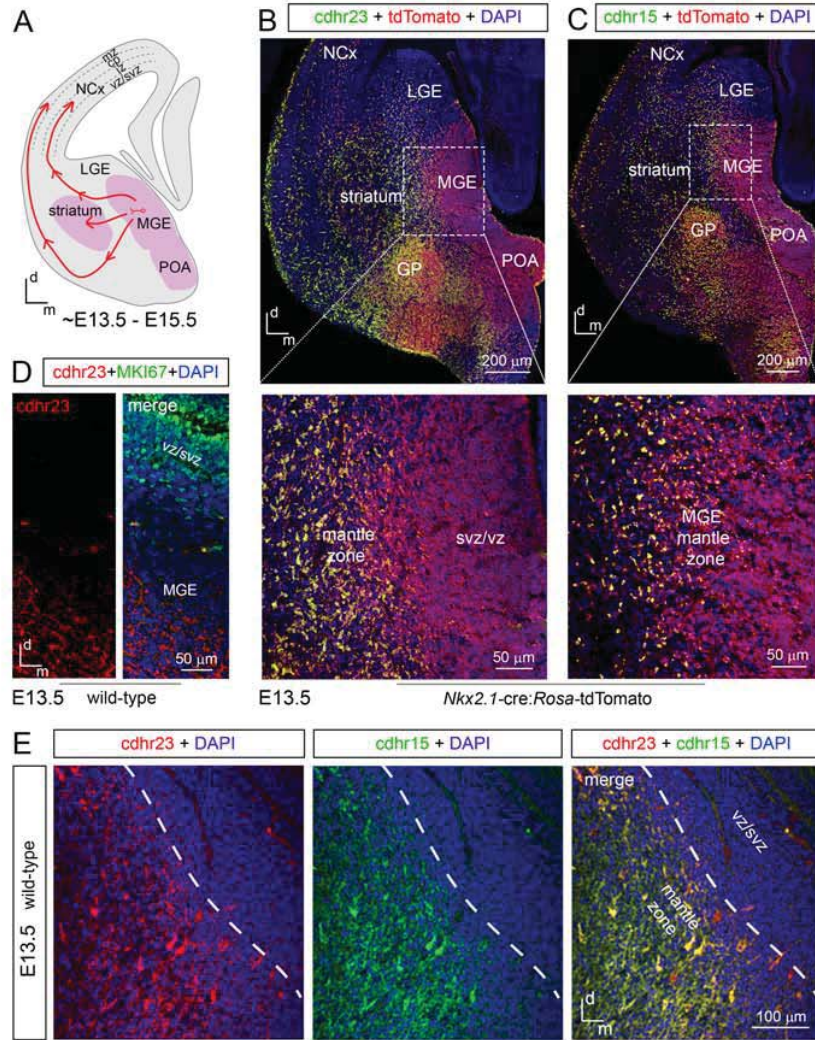


Figure 2

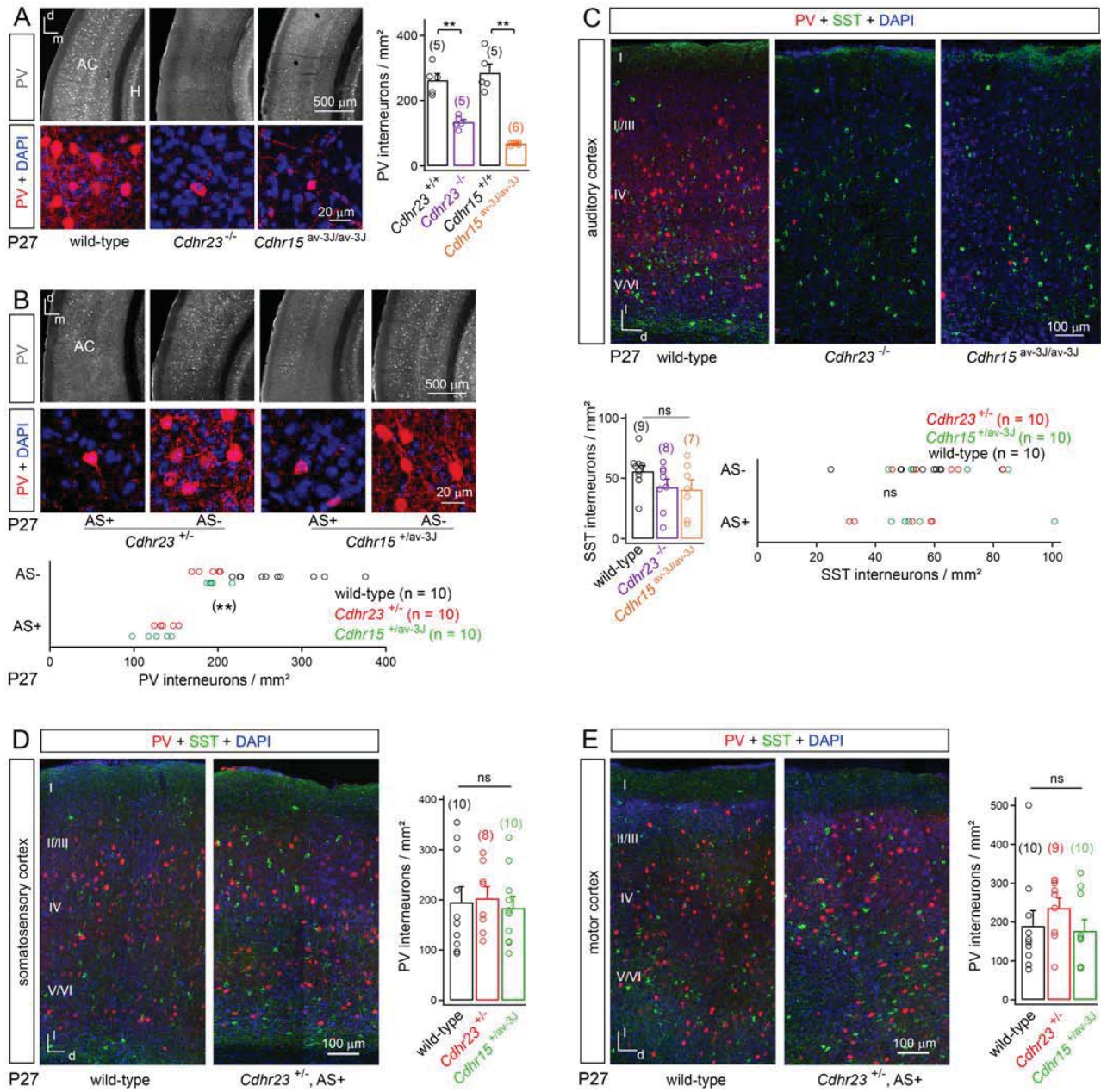


Figure 3

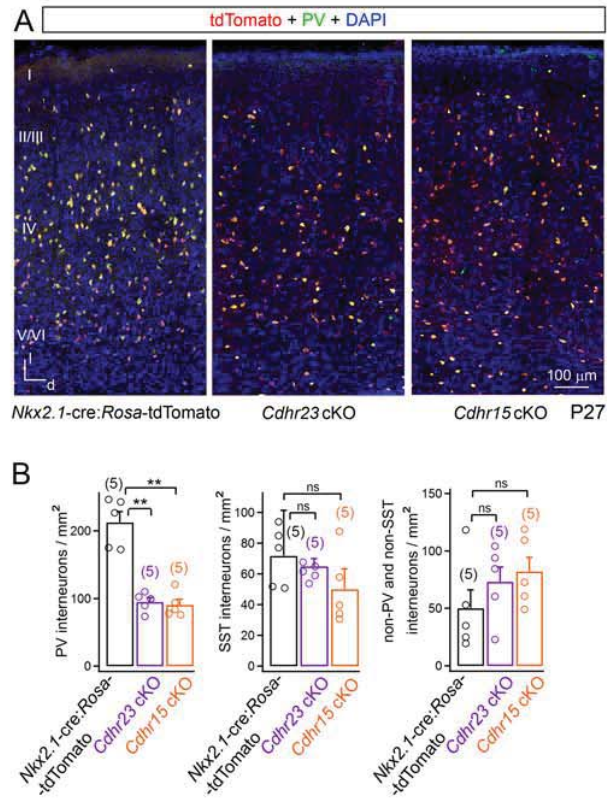


Figure 4

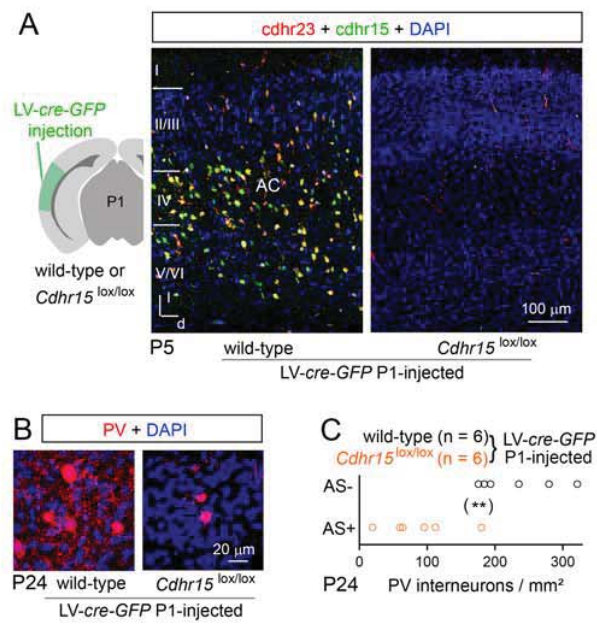


Figure 5

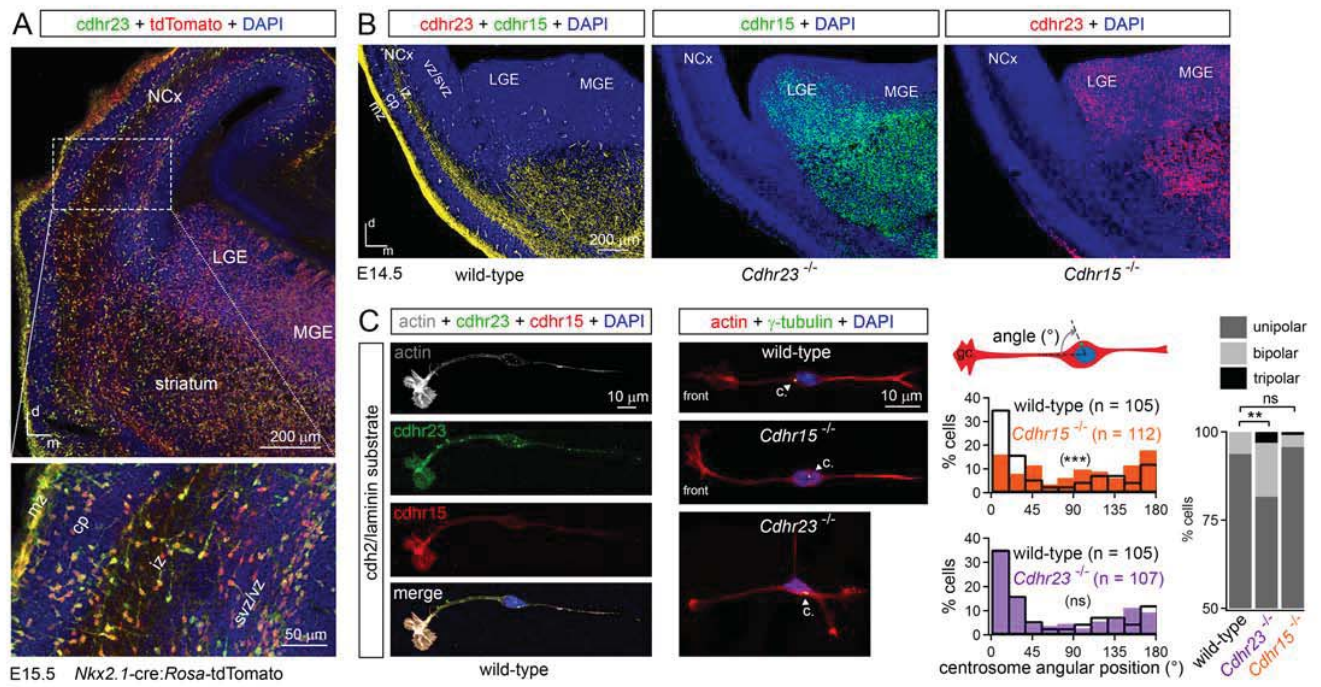


Figure 6

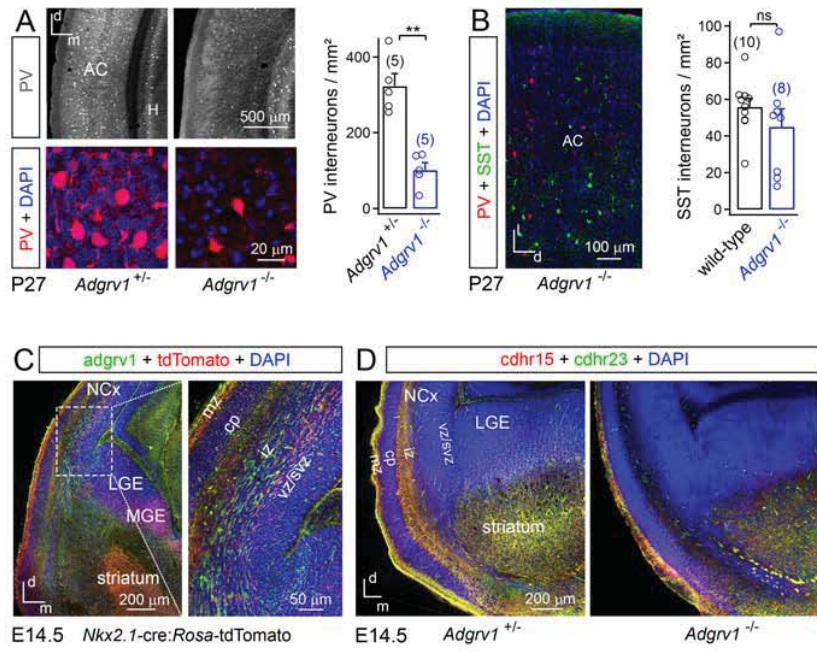


Figure 7

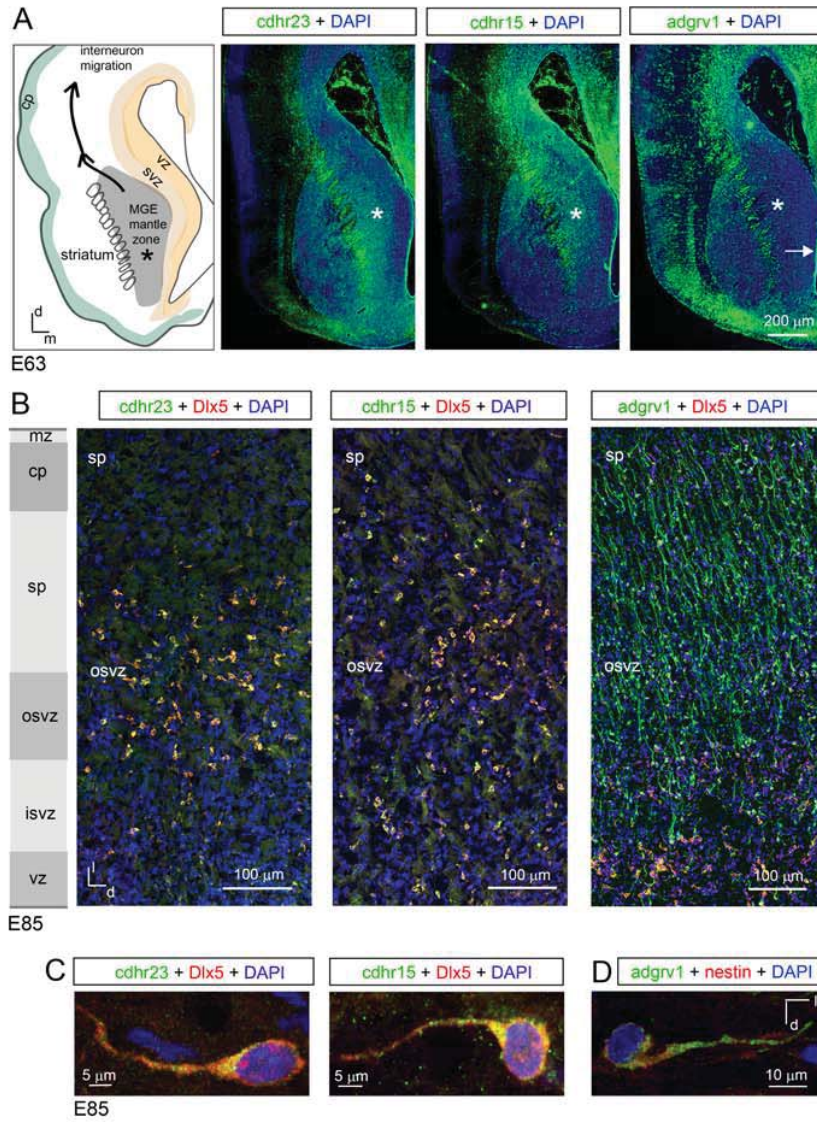


Figure 8

Supporting Information

**Auditory cortex interneuron development
requires cadherins operating
hair-cell mechanoelectrical transduction**

Baptiste Libé-Philippot, Vincent Michel, Jacques Boutet de Monvel, Sébastien Le Gal, Typhaine Dupont, Paul Avan, Christine Métin^{*}, Nicolas Michalski^{*} and Christine Petit^{*#}.

* Joint senior authors

#Correspondence: christine.petit@pasteur.fr

I- Supplementary materials and methods

II- Legends to supplementary figures

Materials and methods

Animals. Animal experiments were performed in accordance with French and European regulations for the care and protection of laboratory animals (EC Directive 2010/63, French Law 2013-118, 6 February 2013), with authorization from the Institut Pasteur ethics committee for animal experimentation. *Adgrv1*^{tm1Msat} (*Adgrv1*^{+/-} and *Adgrv1*^{-/-}) mice and *Nkx2.1-cre* mice were kindly provided by Makoto Sato (University of Fukui, Japan) (34, 63) and Nicoletta Kessarlis (University College London, United Kingdom) (19), respectively. *Cdhr15*^{av-3J} mice, which carry a point mutation resulting in a frameshift and premature stop codon, and *Rosa*-tdTomato mice were obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, USA). *Cdhr23*^{tm1.2Ugds} (*Cdhr23*^{+/-} and *Cdhr23*^{-/-}) mice and *Cdhr23*^{lox/lox} mice, in which lox P sites were introduced into the introns 61 and 68, have been described elsewhere (29). *Cdhr15*^{ex5-fl} (*Cdhr15*^{lox/lox}) mice were generated by the Institut Clinique de la Souris (iCS, Illkirch, France). The targeting vector was constructed as follows. A 0.6 kb fragment encompassing exon 5 was amplified by PCR (from C57Bl/6N ES cells genomic DNA) and inserted into a proprietary iCS vector containing a LoxP site and a floxed and flipped neomycin resistance cassette. A 4.5 kb fragment (corresponding to the 5' homology arm) and a 2.8 kb fragment (corresponding to the 3' homology arm) were amplified by PCR and inserted into the vector obtained in the first step, to produce the final targeting construct. The targeting construct was introduced into C57Bl/6N embryonic stem (ES) cells by electroporation. Clones were selected and identified by PCR with external primers, and their identity was confirmed by Southern blot analysis with 5' and 3' external probes. Two recombinant ES clones were injected into BALB/cN blastocysts, to get male chimeras with germline transmission of the floxed allele. The *Cdhr15*^{lox/lox} mice behaved like wild-type mice. *Cdhr15*^{+/-} and *Cdhr15*^{-/-} mice were obtained by crossing *Cdhr15*^{lox/lox} mice with *PGK-cre* transgenic mice, in which *cre* expression is driven by the ubiquitously expressed early active promoter of the phosphoglycerate kinase-1 (PGK) gene (64). The mice had mixed genetic backgrounds combining C57BL/6JRj and SV/129, except for *Rosa*^{tdTomato} mice, which had a mixture

of C57BL/6JRj, SV/129, and Swiss backgrounds. The wild-type animals for lentiviral vector injections were C57BL/6JRj mice from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France), whereas all other mice described as “wild-type” were littermates of the mutant mice.

Sound stimulation. We assessed susceptibility to audiogenic seizures by delivering continuous pure tones (from 5 kHz to 40 kHz) from a calibrated loudspeaker placed on top of a large Plexiglas cylinder (height: 30 cm; diameter: 15 cm) containing the freely moving mouse. Audiogenic seizures typically occurred as follows: the mice ran about wildly, then underwent tonico-clonic convulsions, tonic hyperextension of the hindlimbs, and a potentially fatal post-ictal depression of consciousness. Stimulation was stopped as soon as the animal began running about wildly, to prevent full-blown seizures (65). We evaluated the proportion of mice displaying audiogenic seizures in P21 to P35 mice, after stimulation with high-intensity (100-110 dB) pure tones (8-15 kHz) lasting up to one minute.

Injection of lentiviral vectors. Mice were anesthetized by hypothermia on P1, or with isoflurane (4% during induction, and then 2% through a mask during injection) on P10. We used a microinjector (Nanoliter 2000, World Precision Instruments, Sarasota, USA) to inject lentiviral vector (70 nL; *Pgk::cre-GFP* or *Pgk::GFP*; 10^7 TU/ml, Kerafast, Boston, USA) bilaterally into the temporal cortex to target the AC, or dorsally into the motor cortex.

Hearing tests. Mice were anesthetized by intraperitoneal xylazine (7.5 mg/kg) and ketamine (75 mg/kg) injections. Auditory brainstem responses (ABRs) (61) were recorded in response to pure tone bursts at frequencies of 5, 10, 15, 20, 32, and 40 kHz. Sound intensities between 15 dB and 115 dB SPL, in 5 dB steps, were tested. ABRs were averaged over 100-200 pure-tone stimulus presentations. ABR thresholds were defined as the lowest stimulus level resulting in recognizable waves. ABR

wave-I amplitude was estimated by measuring the voltage difference between the wave-I peak and the trough between wave-I and wave-II, and ABR wave-I latency was measured as the time from sound stimulation to the wave-I peak. Electrode responses were amplified (gain of 10 000), filtered, digitally converted, and averaged with a compressed-data acquisition system.

Distortion product otoacoustic emissions were collected with a miniature microphone at the entry to the ear canal (62). Two primary pure-tone stimuli of frequencies f_1 and f_2 were applied simultaneously: f_2 was set at different values between 5 and 20 kHz and the f_2/f_1 ratio was kept constant at 1.2. The cubic difference tone at $2f_1 - f_2$, the most prominent distortion product generated by mammalian ears, was measured for primary tone frequencies of equal intensity, from 40 to 75 dB SPL.

Tissue preparation. Cryopreserved brain sections from macaque (*Macaca fascicularis*) embryos (E63 and E85) were provided by Colette Dehay (PrimaLyon Platform, Institut Cellule Souche et Cerveau, INSERM, Bron, France). Midday vaginal plugs were considered to correspond to embryonic day 0.5 (E0.5), for staging purposes. Mouse embryos were dissected and fixed by immersion in 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS). Mouse pup brains were removed before embryo fixation in 4% PFA in PBS. At later stages, mice were deeply anesthetized with xylazine (60 mg/kg) and ketamine (150 mg/kg), by intraperitoneal injection, before intracardiac perfusion with 4% PFA in PBS. Mouse embryonic tissues were postfixed for three days in 4% PFA in PBS, and embedded in 2% agarose for free-floating vibratome slicing (50 μm sections) with a Leica VT1000S (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany), or postfixed overnight in 4% PFA in PBS, protected by immersion in 30% sucrose, and embedded in optimal cutting temperature (OCT) compound (VWR International, Radnor, USA) for cryostat sectioning (20 μm sections). After P20, 50 μm thick free-floating cryosections were cut. Where appropriate, sections were processed on Superfrost Plus slides

(Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany). Standard procedures were used to process samples for immunolabeling.

Immunolabeling. Sections were cut from prepared tissues, permeabilized and blocked in PBS supplemented with 0.25% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and 1% BSA (AppliChem, Darmstadt, Germany). The following primary antibodies were used: rabbit anti-adgrv1 antiserum against the N-terminal region (1:100; Fig. S1A; previously described (37)) for mouse experiments, and rabbit anti-adgrv1 polyclonal antibody directed against the C-terminal region (1:500; Fig. S1A; previously described (59)) for macaque experiments, rabbit anti-caspase-3 polyclonal antibody (1:500; #HPA002643, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA), rabbit anti-cdhr23 polyclonal antibody against extracellular epitopes corresponding to extracellular cadherin repeat 11 (1:300; C1EC11, Fig. S1A; previously described (59)), rabbit anti-cdhr15 polyclonal antibody against the extracellular region next to the transmembrane domain (1:300; P1ExJM, Fig. S1A; previously described (59), Figs. 1A (coronal), 1B, 1D, 2C, 6A, 7B, 9, S2, S7B, S7C-E, S7F-G, S9), mouse anti-cdhr15 monoclonal antibody against extracellular epitopes corresponding to cadherin repeats 7 to 10 (1:300; #sc-377235, Fig. S1A; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA; Figs. 1A (horizontal), 1C, 2E, 6C, 7D, S7A), rabbit anti-doublecortin polyclonal antibody (1:2000; #ab18723, Abcam, Cambridge, United Kingdom), mouse anti-Dlx5 monoclonal antibody (1:500; #SAB1412173, Sigma-Aldrich), chicken anti-GFP polyclonal antibody (1:1000; #ab13970, Abcam), mouse anti-nestin monoclonal antibody (1:1000; #556309, BD Biosciences, Franklin Lake, USA), rabbit anti-MKI67 polyclonal antibody (1:100; #ab15580, Abcam), mouse anti-PV monoclonal antibody (1:500; #SAB4200545, Sigma-Aldrich), rabbit anti-red fluorescent protein polyclonal antibody to detect tdTomato (1:2000; #3993-100, Clontech Laboratories, Mountain View, USA), rabbit anti-SST polyclonal antibody (1:250; #ab22682; Abcam), and mouse anti- γ -tubulin monoclonal antibody (1:500; #T6557; Sigma-Aldrich). The following secondary antibodies were used (1:500): goat anti-chicken Alexa Fluor 488-conjugated

antibodies (#A11039; Life Technologies, Waltham, USA), goat anti-mouse Alexa Fluor 488-conjugated (#A21121; Life Technologies), Atto550-conjugated (#43394; Sigma-Aldrich), and Atto647-conjugated (#50185; Sigma-Aldrich) antibodies, goat anti-rabbit Atto488-conjugated (#18772; Sigma-Aldrich), Atto550-conjugated (#43328; Sigma-Aldrich) and Atto647N-conjugated (#40839; Sigma-Aldrich) antibodies. The epitopes detected by rabbit anti-cdhr23, anti-cdhr15, and mouse anti-Dlx5 antibodies are conserved in the corresponding macaque proteins. The epitope detected by the adgrv1-Cter antibody in macaque is 93% identical to that in mouse. Rabbit anti-cdhr23, anti-cdhr15, and anti-adgrv1-Cter antibodies have already been used in macaque (59). The anti-nestin antibody has been shown to be reactive in primates (DSHB Hybridoma Bank). Actin filaments were stained with Atto-565-conjugated phalloidin (1:1000, #94072, Sigma-Aldrich). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1:7500, #D9542, Sigma-Aldrich). When two primary antibodies for proteins from the same species were used, the same protocol was used, but in two steps (37): staining for one marker only, fixing of the samples in 4% PFA in PBS for 30 minutes, three washes, and then staining for the other marker. Apoptosis was assessed in TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling) assays (Roche, West Sussex, UK) (66).

Samples were mounted in Fluorsave (Calbiochem, San Diego, USA). Images were captured with an LSM-700 confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) with a 63x NA 1.4 Plan Apochromatic oil immersion objective, a 25x NA 0.8 LCI Plan Neofluar objective, a 5x NA 0.16 Plan Apochromatic non-immersion objective, or a 20x NA 0.8 Plan Apochromatic non-immersion objective, or with a MVX10 microscope (Olympus Tokyo, Japan). All images were converted to RGB format with ImageJ (NIH, Bethesda, USA) and processed with Photoshop (Adobe, San José, USA). The images in Figs. 1A, 2B-C, 3A-B (large views), 6A-B, 6C (cdhr23/cdhr15 staining), 7A (large view), 7C-D, 8, S2B-D, S4, S6A, S7A, S8B (detailed views), S9 are single focal sections. The images in Figs. 1B-D, 2D-E, 3A & 3B (detailed views), 3B-E, 4, 5A-B, 6C (γ -tubulin staining), 7A

(detailed view), 7B, S2A, S5, S6B, S7B, S7C-E, S8A, S8B (large views) are mean projected Z-stacks.

Quantification of staining on histological sections. The boundaries of the AC, including the auditory core and belt areas, were determined based on the mouse brain atlas (67). For each animal, five to six coronal sections (60 μm thick) spanning the anterior-posterior axis of the auditory cortex were imaged bilaterally. *Cdhr23⁺/cdhr15⁺ tdTomato⁺*, PV or SST interneuron cell bodies were quantified with the spot detector tool (bright spots on a dark background; sensitivity: 100%) of Icy software (Institut Pasteur, Paris, France). Only cell bodies with diameters exceeding 10 μm were considered. The total number of cell bodies was then normalized by the total surface considered, to obtain a PV interneuron density for each animal. For each animal, the thickness of the AC was quantified on five successive coronal sections (60 μm thick) and then averaged. Surface of the AC was estimated on 5 sections (60 μm thick) spanning the anterior-posterior axis of the AC. The surface was then normalized for each animal by the total number of slices. Cortical thickness and surface of the AC were quantified using the Icy software onto the DAPI channel. Mean fluorescence on E14.5 sections was measured with ImageJ, comparing regions of interest in the subpallium and adjacent embryonic cortex.

Culture of MGE explants and quantification of migration. Sterile glass coverslips were coated with polylysine/laminin (Poly L Lysine hydrobromide #P1524, Sigma-Aldrich; laminin #L2020, Sigma-Aldrich) or polylysine/laminin/*cdh2*, as previously described (32). The *cdh2* substrate was prepared from a *cdh2*-h-Fc chimera (#6626-NC-050, Bio-Techne, Minneapolis, USA). Each MGE from E13.5 embryos was dissected into nine explants, placed on the substrate, and cultured for 19 hours on laminin or 24 hours on *cdh2*/laminin in DMEM-F12 (#31331028, Fisher Scientific, Waltham, USA) supplemented with 37% glucose (#G7021, Sigma-Aldrich), 2% B27 (#17504044, Fisher Scientific),

1% N2 (#17502048, Fisher Scientific), 1% Glutamax, and 20 U/mL penicillin/streptomycin (#15140122, Fisher Scientific). The MGE explants were fixed by incubation in 4% PFA in 0.33 M sucrose phosphate buffer for 24 hours, and processed by standard immunohistochemistry procedures, as described above. In one case (see Fig. 6C), cultured neurons were left unpermeabilized for studies of the extracellular distribution of *cdhr23* and *cdhr15* only.

We characterized potential differences in migration pattern between mutant neurons lacking *cdhr23* or *cdhr15* and wild-type neurons, by considering a subpopulation of MGE neurons sufficiently isolated from the colony after migrating away from the explant. We analyzed the geometric characteristics of the processes and growth cones of the selected neurons, and manually segmented them on the maximum-projected confocal stacks, using a customized Matlab interface. The segmentation process involved a spline-curve delineation of relevant structures, including the cell nucleus and processes. A neuronal process was defined as any process emanating from the cell body and terminating in a growth cone. Any other processes (e.g., branching from a leading process or not terminating in a growth cone) were discarded. We measured the vector running from the centrosome to the center of the cell nucleus, and the angle of this vector relative to the axis of the leading process in unipolar cells.

The migration area (surrounding the explant, excluding the explant itself) was measured with Icy software. For cultures on laminin, the migration areas of the nine explants from a given MGE were summed. For cultures on *cdh2*/laminin, the three explants with the largest migration areas from the nine explants tested for a given MGE were considered as individuals. In this case, the migration area was quantified as the actin-labeled area: $1.67 \pm 0.33 \text{ mm}^2$ ($n = 17$ explants) for the wild-type, $1.35 \pm 0.20 \text{ mm}^2$ ($n = 9$ explants) for *Cdhr23*^{-/-}, and 1.90 ± 0.54 ($n = 27$ explants) for *Cdhr15*^{-/-} explants ($P > 0.4$ for both comparisons between wild-type and mutant explants).

Statistical analysis. Data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (s.e.m). Unless otherwise stated, numbers (n) in the figures and text are the numbers of biological replicates derived from independent biological samples (individual animals). The animals in each experimental group originated from at least two independent mouse litters. Immunolabeling was performed on at least three animals in each case. The data were analyzed with Igor Pro (WaveMetrics), Prism (Graphpad), and the BiostaTGV webtool of R software (Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, INSERM, UPMC, Paris, France). Non-parametric two-tailed Mann-Whitney tests were used to compare unpaired groups. Proportions of mice were compared in Chi squared tests (with Yates' correction) or Fisher's exact tests, depending on sample size. The association between susceptibility to audiogenic seizures and the smaller numbers of AC PV interneurons in grouped *Cdhr23*^{+/-} and *Cdhr15*^{+/av-3J} individuals was assessed in Mann-Whitney tests, after ANOVA for the genotype factor. The distributions of centrosome angular position were compared in Kolmogorov-Smirnov tests. Differences were considered statistically significant if $P < 0.05$. Asterisks on bar graphs indicate the statistical significance of the differences indicated in brackets (*, $P < 0.05$; **, $P < 10^{-2}$; and ***, $P < 10^{-3}$), whereas ns denotes "not significant" ($P > 0.05$).

Supporting Information legends

Supporting Information 1. Cadherin-related proteins of hair cell mechano-electrical transduction are critically involved in the migration of a population of MGE-derived GABAergic interneuron precursors to the auditory cortex

(A) Protein domains of *cdhr23*, *cdhr15*, and *adgrv1*. The positions of the epitopes targeted by the antibodies used in the study are indicated by open boxes. (B) Diagram of the cochlea sensory epithelium showing the inner and outer hair cells (upper panel), and diagram of the hair bundles of mouse auditory hair cells between postnatal day 2 (P2) and P9. *Cdhr23* and *cdhr15* make up the tip-links that gate the mechano-electrical transduction channels, form transient lateral links between stereocilia, and form kinocilial links between the kinocilium and adjacent stereocilia of the tall row. *Adgrv1* forms transient lateral links located at the base of the stereocilia (ankle links). Of those, only the tip-links remain in mature hair bundles. In the mouse auditory hair cells, the kinocilium disappears by P9. (C) Diagram showing the migration pathway of a population of embryonic MGE-derived interneuron precursors co-expressing *Cdhr23* and *Cdhr15*, specifically targeted to the auditory cortex (upper panel), and the defects observed in the migration of *Cdhr15*-expressing and *Cdhr23*-expressing interneuron precursors in *Cdhr23*^{-/-} mice and *Cdhr15*^{-/-} mice, respectively (lower panel). (D) Diagram showing the specific loss of parvalbumin (PV) interneurons in the auditory cortex of *Cdhr23*^{-/-} or *Cdhr15*^{-/-} P27 mice. Abbreviations: l, lateral; m, medial; d, dorsal; NCx, neocortex; L/MGE, lateral/medial ganglionic eminence; (s)vz, (sub)ventricular zone; iz, intermediate zone; cp, cortical plate; mz, marginal zone; E13.5-E15.5, embryonic days 13.5-15.5.

Supporting Information 2. Validation of the specificity of the antibodies directed against cdhr23, cdhr15, and adgrv1 on sections of the telencephalon of *Cdhr23*^{-/-}, *Cdhr15*^{-/-}, and *Adgrv1*^{-/-} embryos, respectively

(A) Coronal section of the AC of a wild-type P7 mouse, immunostained for cdhr23 and cdhr15. (B) Coronal sections of the telencephalon of a wild-type E12.5 mouse embryo, immunostained for cdhr23, cdhr15, or adgrv1. (C) Coronal sections of the telencephalon of *Cdhr23*^{-/-}, *Cdhr15*^{-/-}, and *Adgrv1*^{-/-} E14.5 mouse embryos, immunostained for cdhr23, cdhr15, and adgrv1, respectively. (D) Coronal sections of wild-type E15.5 mouse embryos, immunostained for cdhr23 or cdhr15. Abbreviations: NCx, neocortex; C/L/MGE, caudal/lateral/medial ganglionic eminence; POA, preoptic area; m, medial; d, dorsal.

Supporting Information 3. *Cdhr23*^{+/-} and *Cdhr15*^{+/av-3J} mice have normal auditory brainstem responses (ABRs) and distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs)

ABR thresholds, ABR wave-I amplitude, ABR wave-I latency, and level of 2f₁-f₂ DPOAE recorded for f₁ = 8.3 kHz and f₂ = 10 kHz, in *Cdhr23*^{+/-} (A) and *Cdhr15*^{+/av-3J} (B) mice. Data are means ± s.e.m with individual values (open circles). ns, not significant (non-parametric two-tailed Mann-Whitney tests).

Supporting Information 4. PV interneuron defects in *Cdhr23* cKO and *Cdhr15* cKO mice are restricted to the AC

Coronal sections of the telencephalon of *Nkx2.1*-cre:*Rosa*-tdTomato, *Cdhr23* cKO, and *Cdhr15* cKO P27 mice. Abbreviations: d, dorsal; m, medial; AC, auditory cortex; VC, visual cortex; TeA, temporal association cortex; H, hippocampus.

Supporting Information 5. Characterization of LV-cre-GFP-injected wild-type and *Cdhr15*^{lox/lox} mice

(A) ABR thresholds in LV-cre-GFP P1-injected wild-type and *Cdhr15*^{lox/lox} mice on P24. (B) Coronal sections of the auditory cortex (AC) of LV-cre-GFP P1-injected wild-type and *Cdhr15*^{lox/lox} P5 mice, immunostained for GFP and caspase-3, a protein involved in cell apoptosis (left panel), and detailed view of cortical layer IV immunostained for GFP, caspase-3, and *Dlx5*, a GABAergic interneuron marker (right panel). Data are means ± SEM. ns, not significant (non-parametric two-tailed Mann-Whitney test).

Supporting Information 6. Preservation of the main tangential migration stream of neurons in *Cdhr23*^{-/-} and *Cdhr15*^{-/-} mouse embryos

(A) Coronal sections of the basal telencephalon of wild-type, *Cdhr23*^{-/-}, and *Cdhr15*^{-/-} E14.5 mice, labeled by the TUNEL method. (B) Coronal sections of the telencephalon of wild-type, *Cdhr23*^{-/-}, and *Cdhr15*^{-/-} E14.5 embryos, immunostained for the neuron migration marker doublecortin. Abbreviations: d, dorsal; m, medial; L/MGE, lateral/medial ganglionic eminence; NCx, neocortex; H, hippocampus; (s)vz, (sub)ventricular zone; iz, intermediate zone; cp, cortical plate; mz, marginal zone.

Supporting Information 7. Expression of *Cdhr23* and *Cdhr15* in neurons migrating from MGE explants of wild-type, *Cdhr23*^{-/-}, and *Cdhr15*^{-/-} mouse embryos

(A) Coronal section of the telencephalon of a *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato* E15.5 mouse embryo, immunostained for tdTomato and *cdhr15* (upper panel), and detailed view of the neocortex (lower panel). (B, C) Representative MGE explants from wild-type, *Cdhr23*^{-/-}, and *Cdhr15*^{-/-} E13.5 embryos cultured for 24 hours on a laminin substrate, with quantification of the migration area (B), or cultured for 19 hours on a cdh2/laminin substrate (C) with magnifications of migrating neurons

immunostained for *cdhr23* or *cdhr15* and actin (lower panel), and quantification of the migration area of neurons expressing *cdhr23/cdhr15* relative to the area positive for actin. (*D*, *E*) Representative isolated neurons migrating from cultures of MGE explants of wild-type, *Cdhr23*^{-/-} (*D*), and *Cdhr15*^{-/-} (*E*) mouse embryos, cultured on a *cdh2*/laminin substrate, and immunostained for *cdhr23*, *cdhr15*, and actin. Cell nuclei are stained in blue (DAPI). Abbreviations: L/MGE, lateral/medial ganglionic eminence; NCx, neocortex; (s)vz, (sub)ventricular zone; iz, intermediate zone; cp, cortical plate; mz, marginal zone. Data are means ± s.e.m with individual values (open circles). The number of MGEs (*B*) and explants (*C*) analyzed for each genotype is indicated between brackets. **, $p < 0.01$; ns, not significant (non-parametric two-tailed Mann-Whitney tests).

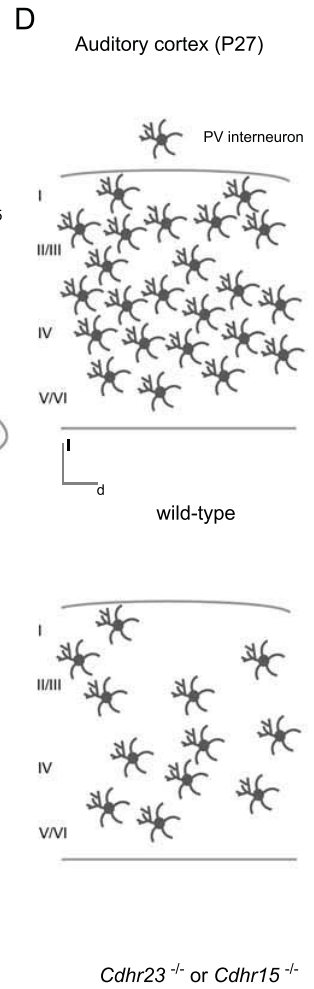
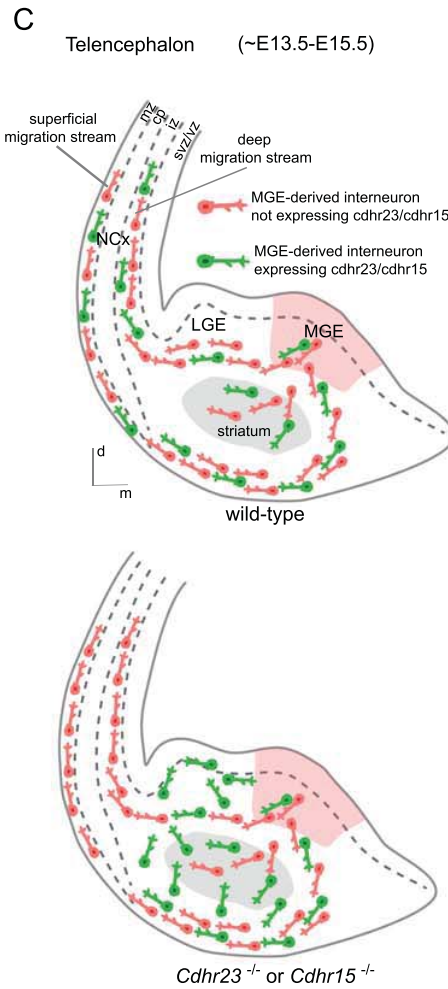
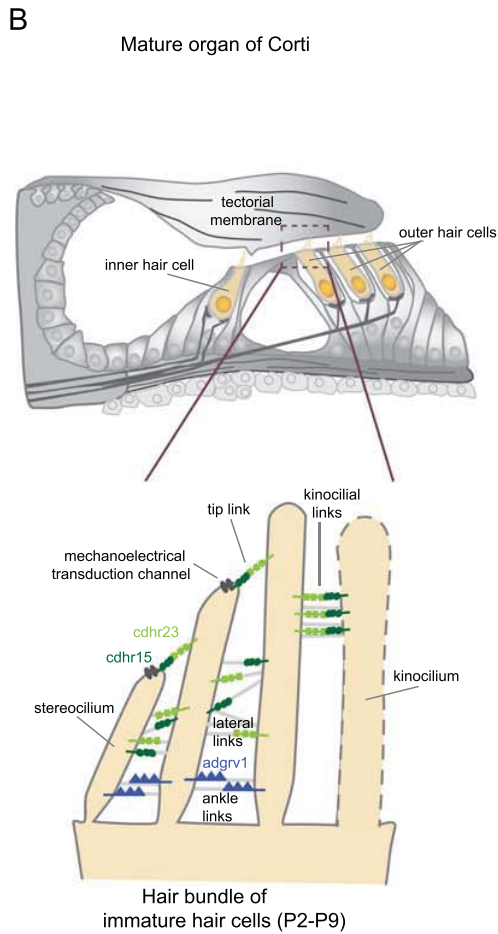
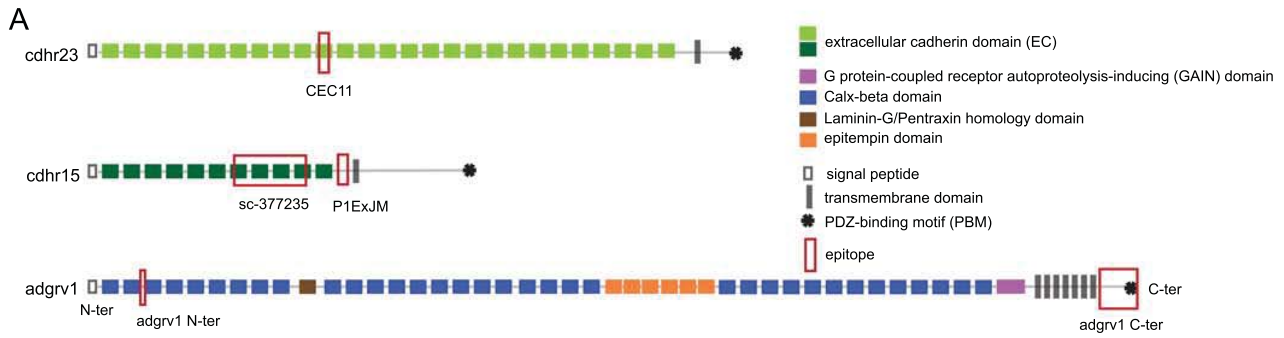
Supporting Information 8. *Adgrv1* is expressed in MGE progenitor cells and auditory cortex radial glia cells

(*A*) Detailed view of the MGE in a wild-type E13.5 mouse embryo, immunostained for *adgrv1* and MKI67. Note the *adgrv1* labeling of the interneuron/glial cell progenitors in the proliferative zones. (*B*) Coronal section of the developing auditory cortex of a *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato* E18.5 mouse embryo, immunostained for tdTomato, and *adgrv1*, with a high-magnification view of a tdTomato⁺ interneuron (*B*, left panel), and for *adgrv1* and nestin, a radial glial marker, with a high magnification of the intermediate zone (*B*, right panel). Cell nuclei are stained in blue (DAPI). Abbreviations: (s)vz, (sub)ventricular zone; d, dorsal; m, medial; l, lateral.

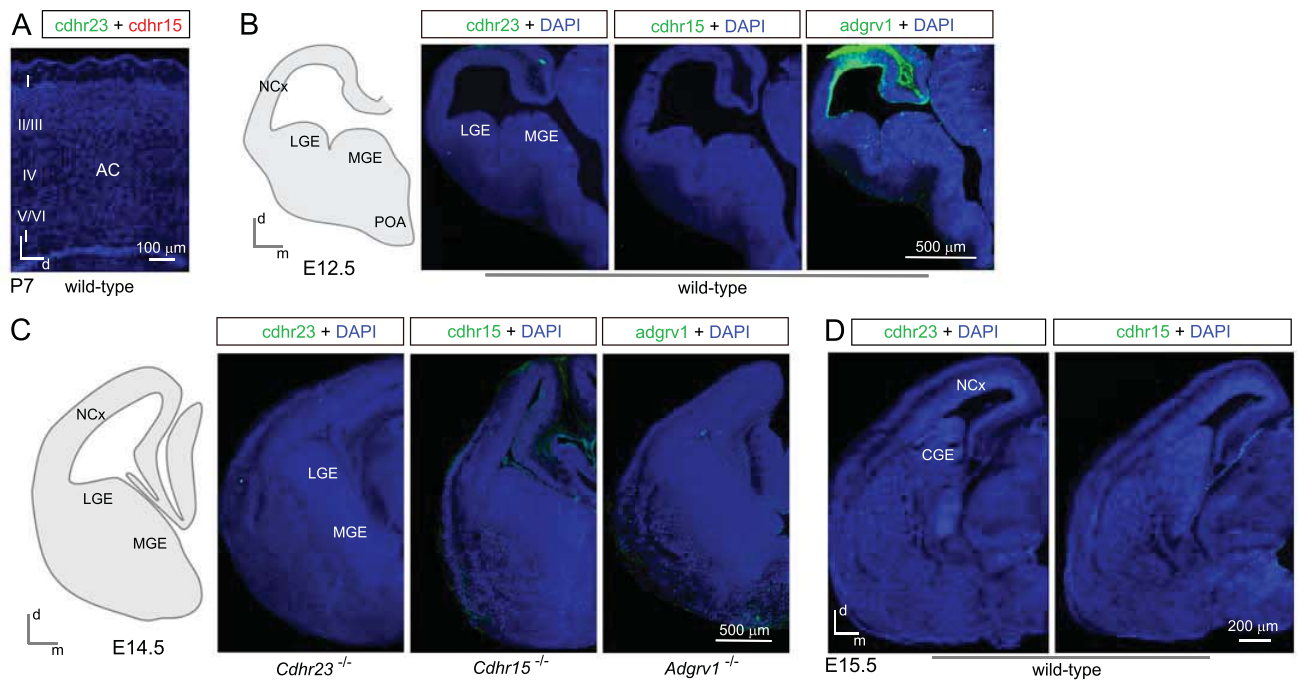
Supporting Information 9. Expression of *Cdhr23*, *Cdhr15* and *Adgrv1* in the developing auditory cortex of macaque embryos

Sagittal sections of the auditory cortex (AC) of an E85 macaque embryo immunostained for *cdhr23*, *cdhr15* or *adgrv1*. The positions of the different cortical layers are shown on the left side diagram.

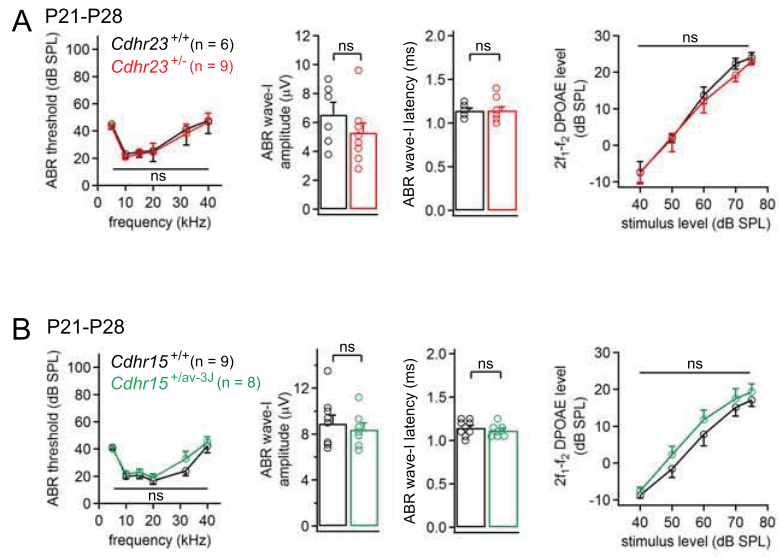
Abbreviations: (s)vz, (sub)ventricular zone; i/o svz, inner/outer svz; iz, intermediate zone; sp, subplate; cp, cortical plate; mz, marginal zone; d, dorsal; l, lateral.



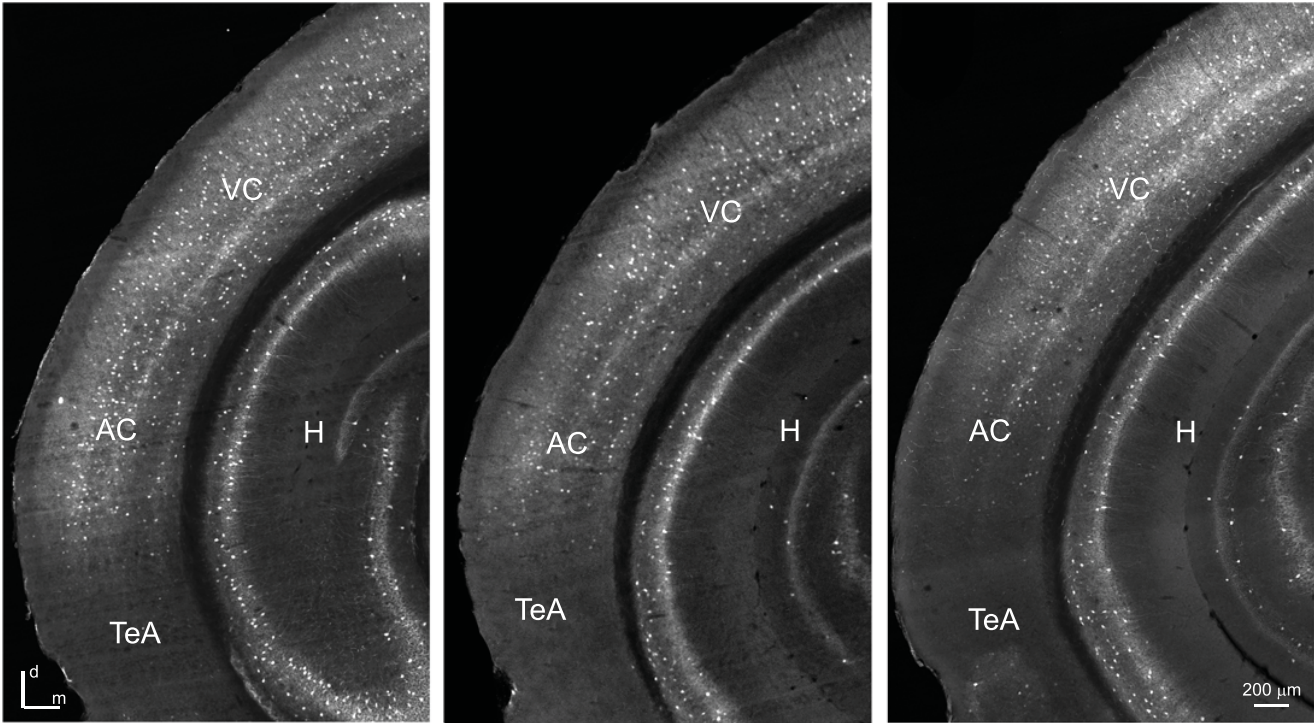
Supporting Information 1



Supporting Information 2



Supporting Information 3

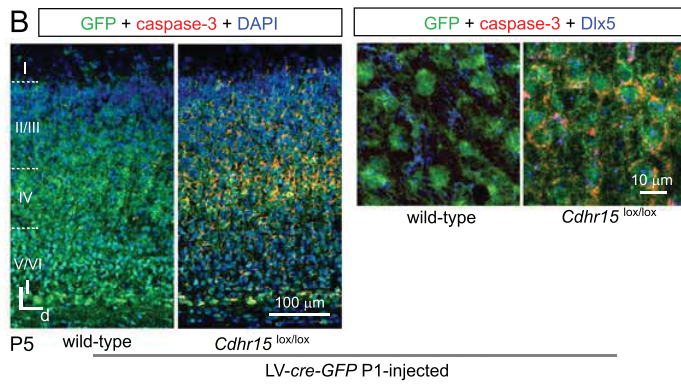
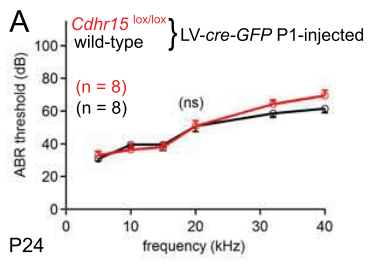


P27 *Nkx2.1-cre:Rosa-tdTomato*

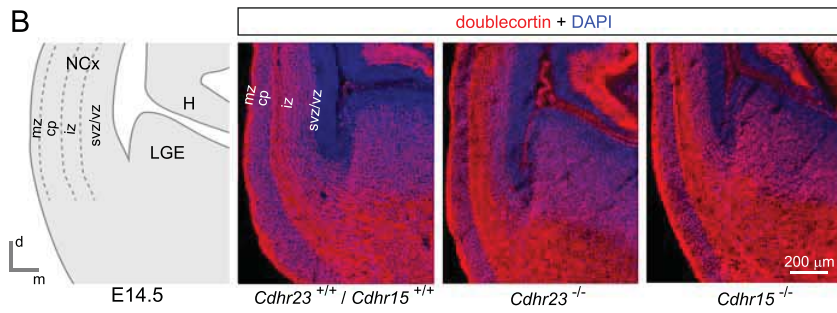
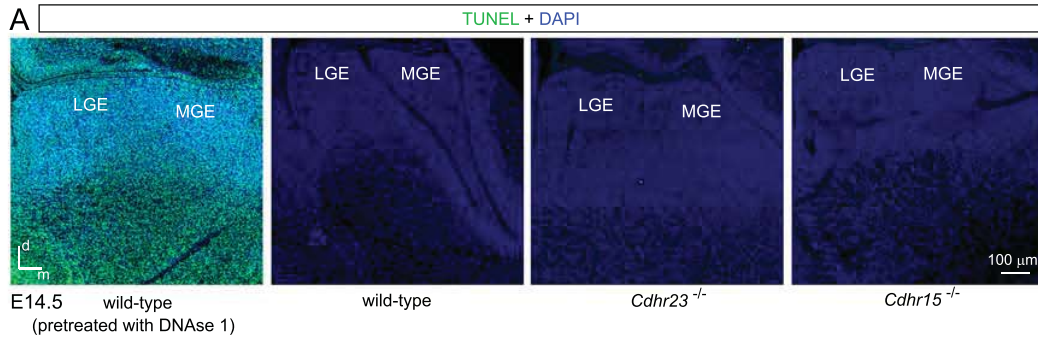
Cdhr23 cKO

Cdhr15 cKO

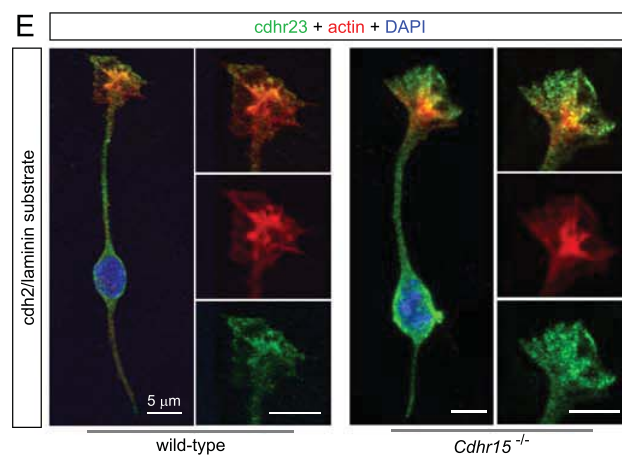
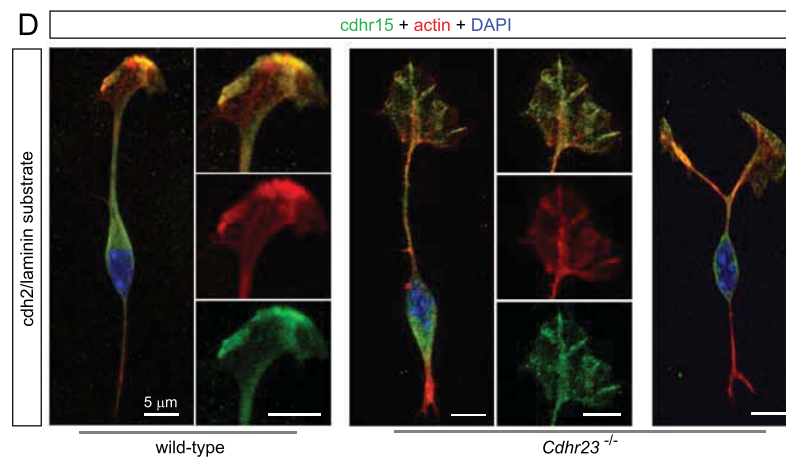
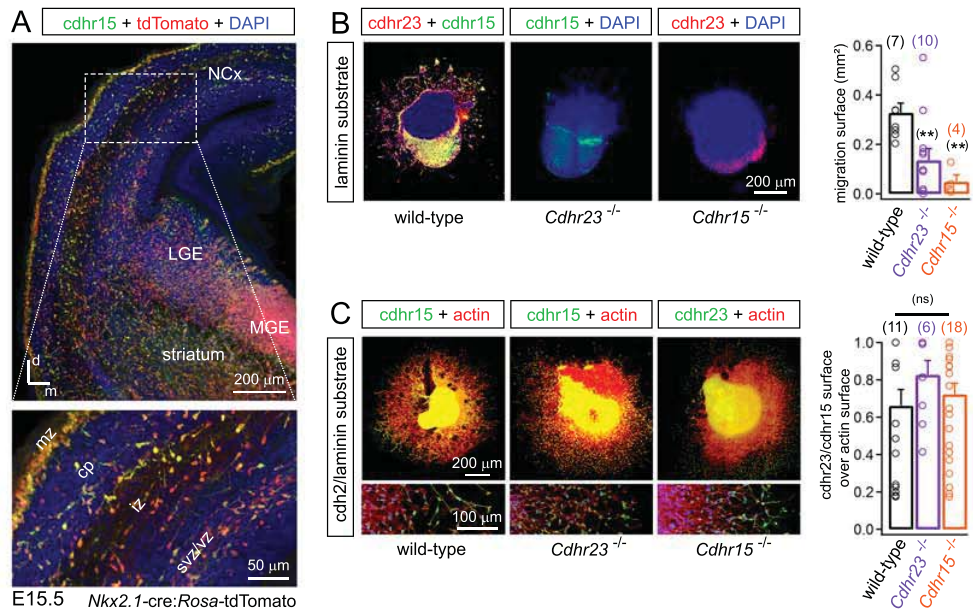
Supporting Information 4



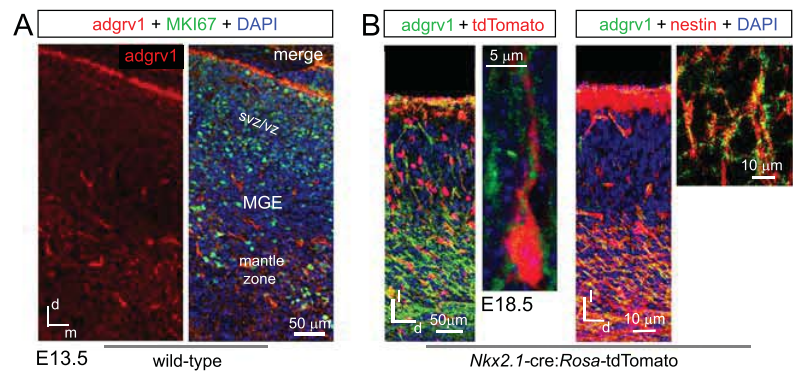
Supporting Information 5



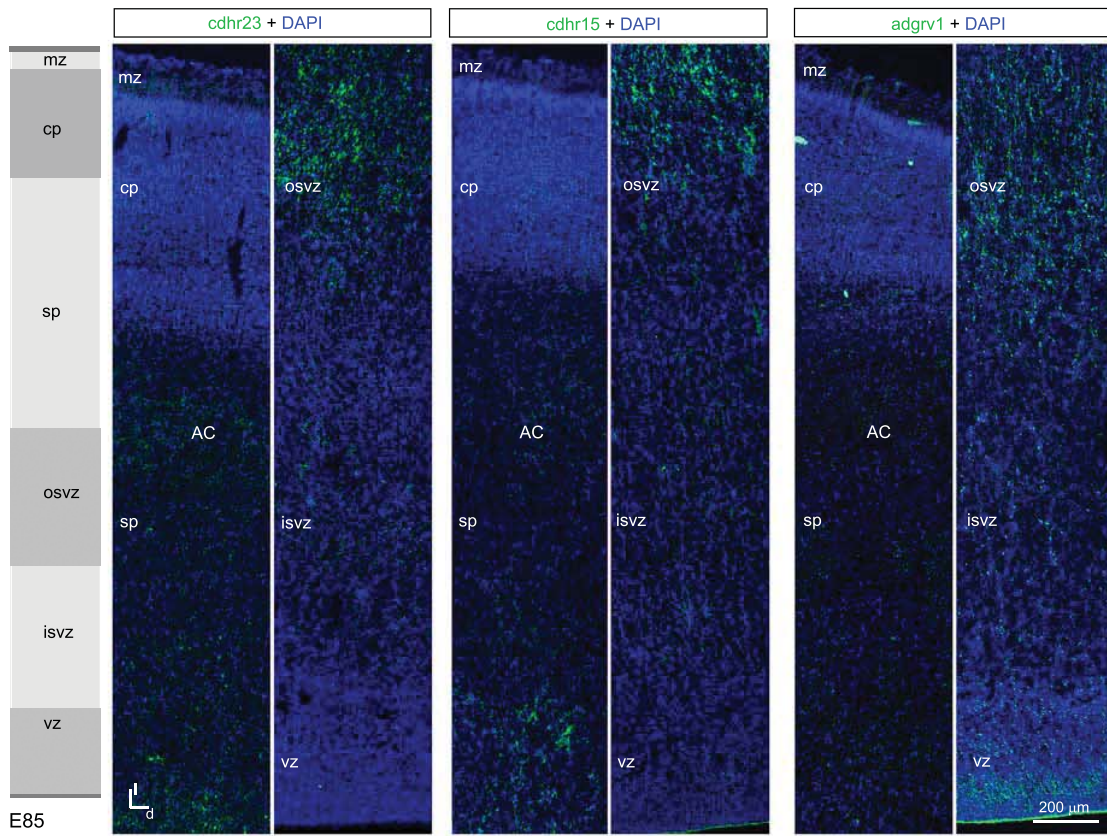
Supporting Information 6



Supporting Information 7



Supporting Information 8



Supporting Information 9

Références

- 1 Weil, D. *et al.* Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* **374**, 60-61, doi:10.1038/374060a0 (1995).
- 2 Gibson, F. *et al.* A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1. *Nature* **374**, 62-64, doi:10.1038/374062a0 (1995).
- 3 Kazmierczak, P. *et al.* Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link filaments in sensory hair cells. *Nature* **449**, 87-91, doi:10.1038/nature06091 (2007).
- 4 McGee, J. *et al.* The very large G-protein-coupled receptor VLGR1: a component of the ankle link complex required for the normal development of auditory hair bundles. *J Neurosci* **26**, 6543-6553, doi:10.1523/JNEUROSCI.0693-06.2006 (2006).
- 5 Michalski, N. *et al.* Molecular characterization of the ankle-link complex in cochlear hair cells and its role in the hair bundle functioning. *J Neurosci* **27**, 6478-6488, doi:10.1523/JNEUROSCI.0342-07.2007 (2007).
- 6 Shin, D., Lin, S. T., Fu, Y. H. & Ptacek, L. J. Very large G protein-coupled receptor 1 regulates myelin-associated glycoprotein via Galphas/Galphaq-mediated protein kinases A/C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 19101-19106, doi:10.1073/pnas.1318501110 (2013).
- 7 Falace, A. *et al.* TBC1D24 regulates neuronal migration and maturation through modulation of the ARF6-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 2337-2342, doi:10.1073/pnas.1316294111 (2014).
- 8 Wu, W. *et al.* Function coupling of otoferlin with GAD65 acts to modulate GABAergic activity. *J Mol Cell Biol* **7**, 168-179, doi:10.1093/jmcb/mjv011 (2015).
- 9 Schug, N. *et al.* Differential expression of otoferlin in brain, vestibular system, immature and mature cochlea of the rat. *Eur J Neurosci* **24**, 3372-3380, doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05225.x (2006).
- 10 Herculano-Houzel, S., Mota, B. & Lent, R. Cellular scaling rules for rodent brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12138-12143, doi:10.1073/pnas.0604911103 (2006).
- 11 Azevedo, F. A. *et al.* Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol* **513**, 532-541, doi:10.1002/cne.21974 (2009).
- 12 Herculano-Houzel, S. The remarkable, yet not extraordinary, human brain as a scaled-up primate brain and its associated cost. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109 Suppl 1**, 10661-10668, doi:10.1073/pnas.1201895109 (2012).
- 13 Rallu, M., Corbin, J. G. & Fishell, G. Parsing the prosencephalon. *Nat Rev Neurosci* **3**, 943-951, doi:10.1038/nrn989 (2002).
- 14 Darnell, D. & Gilbert, S. F. Neuroembryology. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **6**, doi:10.1002/wdev.215 (2017).
- 15 O'Leary, D. D., Chou, S. J. & Sahara, S. Area patterning of the mammalian cortex. *Neuron* **56**, 252-269, doi:10.1016/j.neuron.2007.10.010 (2007).
- 16 Roth, G. & Dicke, U. Evolution of the brain and intelligence. *Trends Cogn Sci* **9**, 250-257, doi:10.1016/j.tics.2005.03.005 (2005).
- 17 Singleton, A. *The central nervous system, chapter 12*, <http://slideplayer.com/slide/7567430/#.WPnRZY0sXuM.google_plusone_share> (2017).
- 18 Golden, J. A. & Chernoff, G. F. Intermittent pattern of neural tube closure in two strains of mice. *Teratology* **47**, 73-80, doi:10.1002/tera.1420470112 (1993).
- 19 O'Rahilly, R. & Muller, F. Neurulation in the normal human embryo. *Ciba Found Symp* **181**, 70-82; discussion 82-79 (1994).
- 20 Nowakowski, R. S. & Hayes, N. L. in *Developmental Neurobiology* (eds Mahendra S. Rao & Marcus Jacobson†) 21-39 (Springer US, 2005).
- 21 Paridaen, J. T. & Huttner, W. B. Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep* **15**, 351-364, doi:10.1002/embr.201438447 (2014).
- 22 Marin, O. & Muller, U. Lineage origins of GABAergic versus glutamatergic neurons in the neocortex. *Curr Opin Neurobiol* **26**, 132-141, doi:10.1016/j.conb.2014.01.015 (2014).
- 23 Rowitch, D. H. & Kriegstein, A. R. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* **468**, 214-222, doi:10.1038/nature09611 (2010).
- 24 Kessar, N. *et al.* Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* **9**, 173-179, doi:10.1038/nn1620 (2006).
- 25 Faux, C., Rakic, S., Andrews, W. & Britto, J. M. Neurons on the move: migration and lamination of cortical interneurons. *Neurosignals* **20**, 168-189, doi:10.1159/000334489 (2012).
- 26 Defelipe, J. The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits, and intellectual creativity. *Front Neuroanat* **5**, 29, doi:10.3389/fnana.2011.00029 (2011).

- 27 Markram, H. *et al.* Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* **5**, 793-807, doi:10.1038/nrn1519 (2004).
- 28 Horton, J. C. & Adams, D. L. The cortical column: a structure without a function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**, 837-862, doi:10.1098/rstb.2005.1623 (2005).
- 29 Ren, J. Q., Aika, Y., Heizmann, C. W. & Kosaka, T. Quantitative analysis of neurons and glial cells in the rat somatosensory cortex, with special reference to GABAergic neurons and parvalbumin-containing neurons. *Exp Brain Res* **92**, 1-14 (1992).
- 30 Beaulieu, C. Numerical data on neocortical neurons in adult rat, with special reference to the GABA population. *Brain Res* **609**, 284-292 (1993).
- 31 van den Aamele, J., Tiberi, L., Vanderhaeghen, P. & Espuny-Camacho, I. Thinking out of the dish: what to learn about cortical development using pluripotent stem cells. *Trends Neurosci* **37**, 334-342, doi:10.1016/j.tins.2014.03.005 (2014).
- 32 Bhide, P. G. Cell cycle kinetics in the embryonic mouse corpus striatum. *J Comp Neurol* **374**, 506-522, doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19961028)374:4<506::AID-CNE3>3.0.CO;2-5 (1996).
- 33 Sheth, A. N. & Bhide, P. G. Concurrent cellular output from two proliferative populations in the early embryonic mouse corpus striatum. *J Comp Neurol* **383**, 220-230 (1997).
- 34 Villar-Cervino, V. *et al.* Molecular mechanisms controlling the migration of striatal interneurons. *J Neurosci* **35**, 8718-8729, doi:10.1523/JNEUROSCI.4317-14.2015 (2015).
- 35 Fjodorova, M., Noakes, Z. & Li, M. How to make striatal projection neurons. *Neurogenesis (Austin)* **2**, e1100227, doi:10.1080/23262133.2015.1100227 (2015).
- 36 Medina, L., Abellan, A., Vicario, A. & Desfilis, E. Evolutionary and developmental contributions for understanding the organization of the basal ganglia. *Brain Behav Evol* **83**, 112-125, doi:10.1159/000357832 (2014).
- 37 Marin, O., Anderson, S. A. & Rubenstein, J. L. Origin and molecular specification of striatal interneurons. *J Neurosci* **20**, 6063-6076 (2000).
- 38 Corbin, J. G. & Butt, S. J. Developmental mechanisms for the generation of telencephalic interneurons. *Dev Neurobiol* **71**, 710-732, doi:10.1002/dneu.20890 (2011).
- 39 Alvarez-Buylla, A., Herrera, D. G. & Wichterle, H. The subventricular zone: source of neuronal precursors for brain repair. *Prog Brain Res* **127**, 1-11 (2000).
- 40 Curtis, M. A. *et al.* Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* **315**, 1243-1249, doi:10.1126/science.1136281 (2007).
- 41 Wu, S. *et al.* Tangential migration and proliferation of intermediate progenitors of GABAergic neurons in the mouse telencephalon. *Development* **138**, 2499-2509, doi:10.1242/dev.063032 (2011).
- 42 Denizet, M. *Rôle de la microglie dans la neurogenèse adulte, dans le bulbe olfactif de la souris* PhD thesis, Université Pierre-et-Marie-Curie, (2016).
- 43 Tanaka, D. H. & Nakajima, K. GABAergic interneuron migration and the evolution of the neocortex. *Dev Growth Differ* **54**, 366-372, doi:10.1111/j.1440-169X.2012.01351.x (2012).
- 44 Bandler, R. C., Mayer, C. & Fishell, G. Cortical interneuron specification: the juncture of genes, time and geometry. *Curr Opin Neurobiol* **42**, 17-24, doi:10.1016/j.conb.2016.10.003 (2016).
- 45 Porteus, M. H. *et al.* DLX-2, MASH-1, and MAP-2 expression and bromodeoxyuridine incorporation define molecularly distinct cell populations in the embryonic mouse forebrain. *J Neurosci* **14**, 6370-6383 (1994).
- 46 de Carlos, J. A., Lopez-Mascaraque, L. & Valverde, F. Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci* **16**, 6146-6156 (1996).
- 47 Anderson, S. A., Eisenstat, D. D., Shi, L. & Rubenstein, J. L. Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science* **278**, 474-476 (1997).
- 48 Tamamaki, N., Fujimori, K. E. & Takaiji, R. Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J Neurosci* **17**, 8313-8323 (1997).
- 49 Zhu, Y., Li, H., Zhou, L., Wu, J. Y. & Rao, Y. Cellular and molecular guidance of GABAergic neuronal migration from an extracortical origin to the neocortex. *Neuron* **23**, 473-485 (1999).
- 50 Bellion, A. & Metin, C. Early regionalisation of the neocortex and the medial ganglionic eminence. *Brain Res Bull* **66**, 402-409, doi:10.1016/j.brainresbull.2005.07.010 (2005).
- 51 Minocha, S. *et al.* Nkx2.1 regulates the generation of telencephalic astrocytes during embryonic development. *Sci Rep* **7**, 43093, doi:10.1038/srep43093 (2017).
- 52 Ribak, C. E. Aspinous and sparsely-spinous stellate neurons in the visual cortex of rats contain glutamic acid decarboxylase. *J Neurocytol* **7**, 461-478 (1978).

- 53 Hendrickson, A. E., Hunt, S. P. & Wu, J. Y. Immunocytochemical localization of glutamic acid
decarboxylase in monkey striate cortex. *Nature* **292**, 605-607 (1981).
- 54 Hatanaka, Y., Zhu, Y., Torigoe, M., Kita, Y. & Murakami, F. From migration to settlement: the
pathways, migration modes and dynamics of neurons in the developing brain. *Proc Jpn Acad
Ser B Phys Biol Sci* **92**, 1-19, doi:10.2183/pjab.92.1 (2016).
- 55 Guo, J. & Anton, E. S. Decision making during interneuron migration in the developing
cerebral cortex. *Trends Cell Biol* **24**, 342-351, doi:10.1016/j.tcb.2013.12.001 (2014).
- 56 Le Magueresse, C. & Monyer, H. GABAergic interneurons shape the functional maturation of
the cortex. *Neuron* **77**, 388-405, doi:10.1016/j.neuron.2013.01.011 (2013).
- 57 Xu, Q., Tam, M. & Anderson, S. A. Fate mapping Nkx2.1-lineage cells in the mouse
telencephalon. *J Comp Neurol* **506**, 16-29, doi:10.1002/cne.21529 (2008).
- 58 Marin, O. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical
interneurons. *Eur J Neurosci* **38**, 2019-2029, doi:10.1111/ejn.12225 (2013).
- 59 Kepecs, A. & Fishell, G. Interneuron cell types are fit to function. *Nature* **505**, 318-326,
doi:10.1038/nature12983 (2014).
- 60 Sussel, L., Marin, O., Kimura, S. & Rubenstein, J. L. Loss of Nkx2.1 homeobox gene function
results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence
for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* **126**, 3359-3370 (1999).
- 61 Lavdas, A. A., Grigoriou, M., Pachnis, V. & Parnavelas, J. G. The medial ganglionic eminence
gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* **19**,
7881-7888 (1999).
- 62 Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J. M., Herrera, D. G. & Alvarez-Buylla, A. Young neurons from
medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. *Nat Neurosci* **2**, 461-466,
doi:10.1038/8131 (1999).
- 63 Rubin, A. N. *et al.* The germinal zones of the basal ganglia but not the septum generate
GABAergic interneurons for the cortex. *J Neurosci* **30**, 12050-12062,
doi:10.1523/JNEUROSCI.6178-09.2010 (2010).
- 64 Fogarty, M. *et al.* Spatial genetic patterning of the embryonic neuroepithelium generates
GABAergic interneuron diversity in the adult cortex. *J Neurosci* **27**, 10935-10946,
doi:10.1523/JNEUROSCI.1629-07.2007 (2007).
- 65 Celio, M. R. Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid-containing neurons of the rat
cerebral cortex. *Science* **231**, 995-997 (1986).
- 66 Nery, S., Fishell, G. & Corbin, J. G. The caudal ganglionic eminence is a source of distinct
cortical and subcortical cell populations. *Nat Neurosci* **5**, 1279-1287, doi:10.1038/nn971
(2002).
- 67 Lopez-Bendito, G. *et al.* Preferential origin and layer destination of GAD65-GFP cortical
interneurons. *Cereb Cortex* **14**, 1122-1133, doi:10.1093/cercor/bhh072 (2004).
- 68 Butt, S. J. *et al.* The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their
physiological subtype. *Neuron* **48**, 591-604, doi:10.1016/j.neuron.2005.09.034 (2005).
- 69 Miyoshi, G. *et al.* Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces
a large and diverse population of superficial cortical interneurons. *J Neurosci* **30**, 1582-1594,
doi:10.1523/JNEUROSCI.4515-09.2010 (2010).
- 70 Gelman, D. *et al.* A wide diversity of cortical GABAergic interneurons derives from the
embryonic preoptic area. *J Neurosci* **31**, 16570-16580, doi:10.1523/JNEUROSCI.4068-
11.2011 (2011).
- 71 Gelman, D. M. *et al.* The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic
interneurons. *J Neurosci* **29**, 9380-9389, doi:10.1523/JNEUROSCI.0604-09.2009 (2009).
- 72 Sultan, K. T., Brown, K. N. & Shi, S. H. Production and organization of neocortical
interneurons. *Front Cell Neurosci* **7**, 221, doi:10.3389/fncel.2013.00221 (2013).
- 73 Wonders, C. P. & Anderson, S. A. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat
Rev Neurosci* **7**, 687-696, doi:10.1038/nrn1954 (2006).
- 74 Jimenez, D., Lopez-Mascaraque, L. M., Valverde, F. & De Carlos, J. A. Tangential migration in
neocortical development. *Dev Biol* **244**, 155-169, doi:10.1006/dbio.2002.0586 (2002).
- 75 Rudy, B., Fishell, G., Lee, S. & Hjerling-Leffler, J. Three groups of interneurons account for
nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol* **71**, 45-61,
doi:10.1002/dneu.20853 (2011).
- 76 Tremblay, R., Lee, S. & Rudy, B. GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular
Properties to Circuits. *Neuron* **91**, 260-292, doi:10.1016/j.neuron.2016.06.033 (2016).
- 77 Inan, M., Welagen, J. & Anderson, S. A. Spatial and temporal bias in the mitotic origins of
somatostatin- and parvalbumin-expressing interneuron subgroups and the chandelier subtype

- in the medial ganglionic eminence. *Cereb Cortex* **22**, 820-827, doi:10.1093/cercor/bhr148 (2012).
- 78 Sousa, V. H., Miyoshi, G., Hjerling-Leffler, J., Karayannis, T. & Fishell, G. Characterization of Nkx6-2-derived neocortical interneuron lineages. *Cereb Cortex* **19 Suppl 1**, i1-10, doi:10.1093/cercor/bhp038 (2009).
- 79 Kessarar, N., Magno, L., Rubin, A. N. & Oliveira, M. G. Genetic programs controlling cortical interneuron fate. *Curr Opin Neurobiol* **26**, 79-87, doi:10.1016/j.conb.2013.12.012 (2014).
- 80 Jaglin, X. H., Hjerling-Leffler, J., Fishell, G. & Batista-Brito, R. The origin of neocortical nitric oxide synthase-expressing inhibitory neurons. *Front Neural Circuits* **6**, 44, doi:10.3389/fncir.2012.00044 (2012).
- 81 Molgaard, S. *et al.* Immunofluorescent visualization of mouse interneuron subtypes. *F1000Res* **3**, 242, doi:10.12688/f1000research.5349.2 (2014).
- 82 Tanahira, C. *et al.* Parvalbumin neurons in the forebrain as revealed by parvalbumin-Cre transgenic mice. *Neurosci Res* **63**, 213-223, doi:10.1016/j.neures.2008.12.007 (2009).
- 83 Moore, A. K. & Wehr, M. Parvalbumin-expressing inhibitory interneurons in auditory cortex are well-tuned for frequency. *J Neurosci* **33**, 13713-13723, doi:10.1523/JNEUROSCI.0663-13.2013 (2013).
- 84 Petilla Interneuron Nomenclature, G. *et al.* Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* **9**, 557-568, doi:10.1038/nrn2402 (2008).
- 85 Ramón y Cajal, S. *Histologie du système nerveux de l'homme & des vertébrés*. Ed. française rev. & mise à jour par l'auteur, tr. de l'espagnol par L. Azoulay. edn, (Maloine, 1909).
- 86 Ramón y Cajal, S. Sur la structure de l'écorce cérébrale de quelques mammifères. *La cellule* **7**, 125-176 (1891).
- 87 Golgi, C. Sulla struttura della sostanza grigia del cervello. *Gazz Med Ital Lombardia* **33**, 244-246 (1873).
- 88 DeFelipe, J. Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Prog Brain Res* **136**, 215-238 (2002).
- 89 Ouellet, L. & de Villiers-Sidani, E. Trajectory of the main GABAergic interneuron populations from early development to old age in the rat primary auditory cortex. *Front Neuroanat* **8**, 40, doi:10.3389/fnana.2014.00040 (2014).
- 90 Mtui, E., Gruener, G. & Dockery, P. *Fitzgerald's clinical neuroanatomy and neuroscience*. (2016).
- 91 Arshad, A. *et al.* Extended Production of Cortical Interneurons into the Third Trimester of Human Gestation. *Cereb Cortex* **26**, 2242-2256, doi:10.1093/cercor/bhv074 (2016).
- 92 Lander, A. D. How cells know where they are. *Science* **339**, 923-927, doi:10.1126/science.1224186 (2013).
- 93 Kohtz, J. D., Baker, D. P., Corte, G. & Fishell, G. Regionalization within the mammalian telencephalon is mediated by changes in responsiveness to Sonic Hedgehog. *Development* **125**, 5079-5089 (1998).
- 94 Ferri, A. *et al.* Sox2 is required for embryonic development of the ventral telencephalon through the activation of the ventral determinants Nkx2.1 and Shh. *Development* **140**, 1250-1261, doi:10.1242/dev.073411 (2013).
- 95 Stoykova, A., Treichel, D., Hallonet, M. & Gruss, P. Pax6 modulates the dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *J Neurosci* **20**, 8042-8050 (2000).
- 96 Corbin, J. G., Rutlin, M., Gaiano, N. & Fishell, G. Combinatorial function of the homeodomain proteins Nkx2.1 and Gsh2 in ventral telencephalic patterning. *Development* **130**, 4895-4906, doi:10.1242/dev.00717 (2003).
- 97 Yun, K., Garel, S., Fischman, S. & Rubenstein, J. L. Patterning of the lateral ganglionic eminence by the Gsh1 and Gsh2 homeobox genes regulates striatal and olfactory bulb histogenesis and the growth of axons through the basal ganglia. *J Comp Neurol* **461**, 151-165, doi:10.1002/cne.10685 (2003).
- 98 Pei, Z. *et al.* Homeobox genes Gsx1 and Gsx2 differentially regulate telencephalic progenitor maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 1675-1680, doi:10.1073/pnas.1008824108 (2011).
- 99 Bulfone, A. *et al.* The mouse Dlx-2 (Tes-1) gene is expressed in spatially restricted domains of the forebrain, face and limbs in midgestation mouse embryos. *Mech Dev* **40**, 129-140 (1993).
- 100 Wang, B. *et al.* Loss of Gsx1 and Gsx2 function rescues distinct phenotypes in Dlx1/2 mutants. *J Comp Neurol* **521**, 1561-1584, doi:10.1002/cne.23242 (2013).
- 101 Lopez-Juarez, A. *et al.* Gsx2 controls region-specific activation of neural stem cells and injury-induced neurogenesis in the adult subventricular zone. *Genes Dev* **27**, 1272-1287, doi:10.1101/gad.217539.113 (2013).

- 102 Toresson, H. & Campbell, K. A role for Gsh1 in the developing striatum and olfactory bulb of
Gsh2 mutant mice. *Development* **128**, 4769-4780 (2001).
- 103 Waters, S. T., Wilson, C. P. & Lewandoski, M. Cloning and embryonic expression analysis of
the mouse Gbx1 gene. *Gene Expr Patterns* **3**, 313-317 (2003).
- 104 Gonzalez, A., Lopez, J. M. & Marin, O. Expression pattern of the homeobox protein NKX2-1 in
the developing Xenopus forebrain. *Brain Res Gene Expr Patterns* **1**, 181-185 (2002).
- 105 Gonzalez, A., Lopez, J. M., Sanchez-Camacho, C. & Marin, O. Regional expression of the
homeobox gene NKX2-1 defines pallidal and interneuronal populations in the basal ganglia of
amphibians. *Neuroscience* **114**, 567-575 (2002).
- 106 Sandberg, M. *et al.* Transcriptional Networks Controlled by NKX2-1 in the Development of
Forebrain GABAergic Neurons. *Neuron* **91**, 1260-1275, doi:10.1016/j.neuron.2016.08.020
(2016).
- 107 Casarosa, S., Fode, C. & Guillemot, F. Mash1 regulates neurogenesis in the ventral
telencephalon. *Development* **126**, 525-534 (1999).
- 108 Ghanem, N. *et al.* Distinct cis-regulatory elements from the Dlx1/Dlx2 locus mark different
progenitor cell populations in the ganglionic eminences and different subtypes of adult cortical
interneurons. *J Neurosci* **27**, 5012-5022, doi:10.1523/JNEUROSCI.4725-06.2007 (2007).
- 109 Liu, Y. H. *et al.* Ascl1 promotes tangential migration and confines migratory routes by
induction of Ephb2 in the telencephalon. *Sci Rep* **7**, 42895, doi:10.1038/srep42895 (2017).
- 110 Kohwi, M. *et al.* A subpopulation of olfactory bulb GABAergic interneurons is derived from
Emx1- and Dlx5/6-expressing progenitors. *J Neurosci* **27**, 6878-6891,
doi:10.1523/JNEUROSCI.0254-07.2007 (2007).
- 111 Eisenstat, D. D. *et al.* DLX-1, DLX-2, and DLX-5 expression define distinct stages of basal
forebrain differentiation. *J Comp Neurol* **414**, 217-237 (1999).
- 112 Panganiban, G. & Rubenstein, J. L. Developmental functions of the Distal-less/Dlx homeobox
genes. *Development* **129**, 4371-4386 (2002).
- 113 Du, T., Xu, Q., Ocbina, P. J. & Anderson, S. A. NKX2.1 specifies cortical interneuron fate by
activating Lhx6. *Development* **135**, 1559-1567, doi:10.1242/dev.015123 (2008).
- 114 Butt, S. J. *et al.* The requirement of Nkx2-1 in the temporal specification of cortical interneuron
subtypes. *Neuron* **59**, 722-732, doi:10.1016/j.neuron.2008.07.031 (2008).
- 115 Hernandez-Miranda, L. R., Parnavelas, J. G. & Chiara, F. Molecules and mechanisms
involved in the generation and migration of cortical interneurons. *ASN Neuro* **2**, e00031,
doi:10.1042/AN20090053 (2010).
- 116 Cobos, I., Long, J. E., Thwin, M. T. & Rubenstein, J. L. Cellular patterns of transcription factor
expression in developing cortical interneurons. *Cereb Cortex* **16 Suppl 1**, i82-88,
doi:10.1093/cercor/bhk003 (2006).
- 117 Liodis, P. *et al.* Lhx6 activity is required for the normal migration and specification of cortical
interneuron subtypes. *J Neurosci* **27**, 3078-3089, doi:10.1523/JNEUROSCI.3055-06.2007
(2007).
- 118 Neves, G. *et al.* The LIM homeodomain protein Lhx6 regulates maturation of interneurons and
network excitability in the mammalian cortex. *Cereb Cortex* **23**, 1811-1823,
doi:10.1093/cercor/bhs159 (2013).
- 119 Katayama, K. *et al.* RhoA and Cdc42 are required in pre-migratory progenitors of the medial
ganglionic eminence ventricular zone for proper cortical interneuron migration. *Development*
140, 3139-3145, doi:10.1242/dev.092585 (2013).
- 120 Vidaki, M. *et al.* Rac1-dependent cell cycle exit of MGE precursors and GABAergic
interneuron migration to the cortex. *Cereb Cortex* **22**, 680-692, doi:10.1093/cercor/bhr145
(2012).
- 121 Tivodar, S. *et al.* Rac-GTPases Regulate Microtubule Stability and Axon Growth of Cortical
GABAergic Interneurons. *Cereb Cortex* **25**, 2370-2382, doi:10.1093/cercor/bhu037 (2015).
- 122 Musgrove, E. A., Caldon, C. E., Barraclough, J., Stone, A. & Sutherland, R. L. Cyclin D as a
therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer* **11**, 558-572, doi:10.1038/nrc3090 (2011).
- 123 Hydbring, P., Malumbres, M. & Sicinski, P. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and
cyclin-dependent kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 280-292, doi:10.1038/nrm.2016.27
(2016).
- 124 Glickstein, S. B., Monaghan, J. A., Koeller, H. B., Jones, T. K. & Ross, M. E. Cyclin D2 is
critical for intermediate progenitor cell proliferation in the embryonic cortex. *J Neurosci* **29**,
9614-9624, doi:10.1523/JNEUROSCI.2284-09.2009 (2009).

- 125 Glickstein, S. B., Alexander, S. & Ross, M. E. Differences in cyclin D2 and D1 protein
expression distinguish forebrain progenitor subsets. *Cereb Cortex* **17**, 632-642,
doi:10.1093/cercor/bhk008 (2007).
- 126 Glickstein, S. B. *et al.* Selective cortical interneuron and GABA deficits in cyclin D2-null mice.
Development **134**, 4083-4093, doi:10.1242/dev.008524 (2007).
- 127 Ross, M. E. Cell cycle regulation and interneuron production. *Dev Neurobiol* **71**, 2-9,
doi:10.1002/dneu.20823 (2011).
- 128 Petros, T. J., Bultje, R. S., Ross, M. E., Fishell, G. & Anderson, S. A. Apical versus Basal
Neurogenesis Directs Cortical Interneuron Subclass Fate. *Cell Rep* **13**, 1090-1095,
doi:10.1016/j.celrep.2015.09.079 (2015).
- 129 Tischfield, D. J., Kim, J. & Anderson, S. A. Atypical PKC and Notch Inhibition Differentially
Modulate Cortical Interneuron Subclass Fate from Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports*,
doi:10.1016/j.stemcr.2017.03.015 (2017).
- 130 Gulacsi, A. A. & Anderson, S. A. Beta-catenin-mediated Wnt signaling regulates neurogenesis
in the ventral telencephalon. *Nat Neurosci* **11**, 1383-1391, doi:10.1038/nn.2226 (2008).
- 131 Andrews, W. *et al.* The role of Slit-Robo signaling in the generation, migration and
morphological differentiation of cortical interneurons. *Dev Biol* **313**, 648-658,
doi:10.1016/j.ydbio.2007.10.052 (2008).
- 132 Yeh, M. L. *et al.* Robo1 modulates proliferation and neurogenesis in the developing neocortex.
J Neurosci **34**, 5717-5731, doi:10.1523/JNEUROSCI.4256-13.2014 (2014).
- 133 Ka, M., Smith, A. L. & Kim, W. Y. MTOR controls genesis and autophagy of GABAergic
interneurons during brain development. *Autophagy*, 0, doi:10.1080/15548627.2017.1327927
(2017).
- 134 Denaxa, M. *et al.* Maturation-promoting activity of SATB1 in MGE-derived cortical
interneurons. *Cell Rep* **2**, 1351-1362, doi:10.1016/j.celrep.2012.10.003 (2012).
- 135 Close, J. *et al.* Satb1 is an activity-modulated transcription factor required for the terminal
differentiation and connectivity of medial ganglionic eminence-derived cortical interneurons. *J
Neurosci* **32**, 17690-17705, doi:10.1523/JNEUROSCI.3583-12.2012 (2012).
- 136 Zechel, S., Zajac, P., Lonnerberg, P., Ibanez, C. F. & Linnarsson, S. Topographical
transcriptome mapping of the mouse medial ganglionic eminence by spatially resolved RNA-
seq. *Genome Biol* **15**, 486, doi:10.1186/s13059-014-0486-z (2014).
- 137 Chen, Y. J. *et al.* Single-cell RNA sequencing identifies distinct mouse medial ganglionic
eminence cell types. *Sci Rep* **7**, 45656, doi:10.1038/srep45656 (2017).
- 138 Ng, H. X., Lee, E. P., Cavanagh, B. L., Britto, J. M. & Tan, S. S. A method for isolating cortical
interneurons sharing the same birthdays for gene expression studies. *Exp Neurol*,
doi:10.1016/j.expneurol.2017.05.006 (2017).
- 139 Taniguchi, H., Lu, J. & Huang, Z. J. The spatial and temporal origin of chandelier cells in
mouse neocortex. *Science* **339**, 70-74, doi:10.1126/science.1227622 (2013).
- 140 Valcanis, H. & Tan, S. S. Layer specification of transplanted interneurons in developing mouse
neocortex. *J Neurosci* **23**, 5113-5122 (2003).
- 141 Miyoshi, G. & Fishell, G. GABAergic interneuron lineages selectively sort into specific cortical
layers during early postnatal development. *Cereb Cortex* **21**, 845-852,
doi:10.1093/cercor/bhq155 (2011).
- 142 Wonders, C. P. *et al.* A spatial bias for the origins of interneuron subgroups within the medial
ganglionic eminence. *Dev Biol* **314**, 127-136, doi:10.1016/j.ydbio.2007.11.018 (2008).
- 143 Lodato, S. *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* **31**, 4650-4662, doi:10.1523/JNEUROSCI.6580-10.2011 (2011).
- 144 Xu, Q. *et al.* Sonic hedgehog signaling confers ventral telencephalic progenitors with distinct
cortical interneuron fates. *Neuron* **65**, 328-340, doi:10.1016/j.neuron.2010.01.004 (2010).
- 145 Flames, N. *et al.* Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial
expression of transcriptional codes. *J Neurosci* **27**, 9682-9695,
doi:10.1523/JNEUROSCI.2750-07.2007 (2007).
- 146 Potter, G. B. *et al.* Generation of Cre-transgenic mice using Dlx1/Dlx2 enhancers and their
characterization in GABAergic interneurons. *Mol Cell Neurosci* **40**, 167-186,
doi:10.1016/j.mcn.2008.10.003 (2009).
- 147 Shimamura, K., Hartigan, D. J., Martinez, S., Puellas, L. & Rubenstein, J. L. Longitudinal
organization of the anterior neural plate and neural tube. *Development* **121**, 3923-3933
(1995).

- 148 Machold, R. *et al.* Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* **39**, 937-950 (2003).
- 149 Gulacsi, A. & Anderson, S. A. Shh maintains Nkx2.1 in the MGE by a Gli3-independent mechanism. *Cereb Cortex* **16 Suppl 1**, i89-95, doi:10.1093/cercor/bhk018 (2006).
- 150 Xu, Q., Wonders, C. P. & Anderson, S. A. Sonic hedgehog maintains the identity of cortical interneuron progenitors in the ventral telencephalon. *Development* **132**, 4987-4998, doi:10.1242/dev.02090 (2005).
- 151 Zheng, Q. Y. *et al.* Digenic inheritance of deafness caused by mutations in genes encoding cadherin 23 and protocadherin 15 in mice and humans. *Hum Mol Genet* **14**, 103-111, doi:10.1093/hmg/ddi010 (2005).
- 152 Flandin, P. *et al.* Lhx6 and Lhx8 coordinately induce neuronal expression of Shh that controls the generation of interneuron progenitors. *Neuron* **70**, 939-950, doi:10.1016/j.neuron.2011.04.020 (2011).
- 153 Mukhopadhyay, A., McGuire, T., Peng, C. Y. & Kessler, J. A. Differential effects of BMP signaling on parvalbumin and somatostatin interneuron differentiation. *Development* **136**, 2633-2642, doi:10.1242/dev.034439 (2009).
- 154 Andrews, W. D., Barber, M., Nemitz, M., Memi, F. & Parnavelas, J. G. Semaphorin3A-neuropilin1 signalling is involved in the generation of cortical interneurons. *Brain Struct Funct*, doi:10.1007/s00429-016-1337-3 (2016).
- 155 Pasterkamp, R. J. Getting neural circuits into shape with semaphorins. *Nat Rev Neurosci* **13**, 605-618, doi:10.1038/nrn3302 (2012).
- 156 Andrews, W. D., Davidson, K., Tamamaki, N., Ruhrberg, C. & Parnavelas, J. G. Altered proliferative ability of neuronal progenitors in PlexinA1 mutant mice. *J Comp Neurol* **524**, 518-534, doi:10.1002/cne.23806 (2016).
- 157 Brown, K. N. *et al.* Clonal production and organization of inhibitory interneurons in the neocortex. *Science* **334**, 480-486, doi:10.1126/science.1208884 (2011).
- 158 Sultan, K. T. *et al.* Clonally Related GABAergic Interneurons Do Not Randomly Disperse but Frequently Form Local Clusters in the Forebrain. *Neuron* **92**, 31-44, doi:10.1016/j.neuron.2016.09.033 (2016).
- 159 Ciceri, G. *et al.* Lineage-specific laminar organization of cortical GABAergic interneurons. *Nat Neurosci* **16**, 1199-1210, doi:10.1038/nn.3485 (2013).
- 160 Mayer, C. *et al.* Clonally Related Forebrain Interneurons Disperse Broadly across Both Functional Areas and Structural Boundaries. *Neuron* **87**, 989-998, doi:10.1016/j.neuron.2015.07.011 (2015).
- 161 Mayer, C., Bandler, R. C. & Fishell, G. Lineage Is a Poor Predictor of Interneuron Positioning within the Forebrain. *Neuron* **92**, 45-51, doi:10.1016/j.neuron.2016.09.035 (2016).
- 162 Harwell, C. C. *et al.* Wide Dispersion and Diversity of Clonally Related Inhibitory Interneurons. *Neuron* **87**, 999-1007, doi:10.1016/j.neuron.2015.07.030 (2015).
- 163 Sultan, K. T., Shi, W. & Shi, S. H. Clonal origins of neocortical interneurons. *Curr Opin Neurobiol* **26**, 125-131, doi:10.1016/j.conb.2014.01.010 (2014).
- 164 Turrero Garcia, M., Mazzola, E. & Harwell, C. C. Lineage Relationships Do Not Drive MGE/PoA-Derived Interneuron Clustering in the Brain. *Neuron* **92**, 52-58, doi:10.1016/j.neuron.2016.09.034 (2016).
- 165 Van Eden, C. G., Mrzljak, L., Voorn, P. & Uylings, H. B. Prenatal development of GABA-ergic neurons in the neocortex of the rat. *J Comp Neurol* **289**, 213-227, doi:10.1002/cne.902890204 (1989).
- 166 DeDiego, I., Smith-Fernandez, A. & Fairen, A. Cortical cells that migrate beyond area boundaries: characterization of an early neuronal population in the lower intermediate zone of prenatal rats. *Eur J Neurosci* **6**, 983-997 (1994).
- 167 Parnavelas, J. G., Barfield, J. A., Franke, E. & Luskin, M. B. Separate progenitor cells give rise to pyramidal and nonpyramidal neurons in the rat telencephalon. *Cereb Cortex* **1**, 463-468 (1991).
- 168 Mione, M. C., Danevic, C., Boardman, P., Harris, B. & Parnavelas, J. G. Lineage analysis reveals neurotransmitter (GABA or glutamate) but not calcium-binding protein homogeneity in clonally related cortical neurons. *J Neurosci* **14**, 107-123 (1994).
- 169 Anderson, S. A., Marin, O., Horn, C., Jennings, K. & Rubenstein, J. L. Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* **128**, 353-363 (2001).
- 170 Nadarajah, B., Alifragis, P., Wong, R. O. & Parnavelas, J. G. Ventricle-directed migration in the developing cerebral cortex. *Nat Neurosci* **5**, 218-224, doi:10.1038/nn813 (2002).

- 171 Cooper, J. A. Cell biology in neuroscience: mechanisms of cell migration in the nervous
system. *J Cell Biol* **202**, 725-734, doi:10.1083/jcb.201305021 (2013).
- 172 Corbin, J. G., Nery, S. & Fishell, G. Telencephalic cells take a tangent: non-radial migration in
the mammalian forebrain. *Nat Neurosci* **4 Suppl**, 1177-1182, doi:10.1038/nn749 (2001).
- 173 Hansen, D. V. *et al.* Non-epithelial stem cells and cortical interneuron production in the human
ganglionic eminences. *Nat Neurosci* **16**, 1576-1587, doi:10.1038/nn.3541 (2013).
- 174 Valiente, M. & Martini, F. J. Migration of cortical interneurons relies on branched leading
process dynamics. *Cell Adh Migr* **3**, 278-280 (2009).
- 175 Wichterle, H., Turnbull, D. H., 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* **128**, 3759-3771 (2001).
- 176 Polleux, F., Whitford, K. L., Dijkhuizen, P. A., Vitalis, T. & Ghosh, A. Control of cortical
interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development* **129**, 3147-
3160 (2002).
- 177 Marin, O. & Rubenstein, J. L. Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* **26**, 441-483,
doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131058 (2003).
- 178 Metin, C., Baudoin, J. P., Rakic, S. & Parnavelas, J. G. Cell and molecular mechanisms
involved in the migration of cortical interneurons. *Eur J Neurosci* **23**, 894-900,
doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04630.x (2006).
- 179 Ang, E. S., Jr., Haydar, T. F., Gluncic, V. & Rakic, P. Four-dimensional migratory coordinates
of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. *J Neurosci* **23**, 5805-5815 (2003).
- 180 Nadarajah, B. & Parnavelas, J. G. Modes of neuronal migration in the developing cerebral
cortex. *Nat Rev Neurosci* **3**, 423-432, doi:10.1038/nrn845 (2002).
- 181 Tanaka, D. H. *et al.* Random walk behavior of migrating cortical interneurons in the marginal
zone: time-lapse analysis in flat-mount cortex. *J Neurosci* **29**, 1300-1311,
doi:10.1523/JNEUROSCI.5446-08.2009 (2009).
- 182 Martini, F. J. *et al.* Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during
tangential neuronal migration. *Development* **136**, 41-50, doi:10.1242/dev.025502 (2009).
- 183 Kelsom, C. & Lu, W. Development and specification of GABAergic cortical interneurons. *Cell
Biosci* **3**, 19, doi:10.1186/2045-3701-3-19 (2013).
- 184 Marin, O. *et al.* Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on
subcortical Slit1/2-independent repulsion and cortical attraction. *Development* **130**, 1889-1901
(2003).
- 185 Tanaka, D., Nakaya, Y., Yanagawa, Y., Obata, K. & Murakami, F. Multimodal tangential
migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins.
Development **130**, 5803-5813, doi:10.1242/dev.00825 (2003).
- 186 Cuevas, E. *et al.* Transient maternal hypothyroxinemia at onset of corticogenesis alters
tangential migration of medial ganglionic eminence-derived neurons. *Eur J Neurosci* **22**, 541-
551, doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04243.x (2005).
- 187 Nakajima, K. Control of tangential/non-radial migration of neurons in the developing cerebral
cortex. *Neurochem Int* **51**, 121-131, doi:10.1016/j.neuint.2007.05.006 (2007).
- 188 Tanaka, D. H., Maekawa, K., Yanagawa, Y., Obata, K. & Murakami, F. Multidirectional and
multizonal tangential migration of GABAergic interneurons in the developing cerebral cortex.
Development **133**, 2167-2176, doi:10.1242/dev.02382 (2006).
- 189 Yokota, Y. *et al.* Radial glial dependent and independent dynamics of interneuronal migration
in the developing cerebral cortex. *PLoS One* **2**, e794, doi:10.1371/journal.pone.0000794
(2007).
- 190 Higuchi, Y., Kita, Y. & Murakami, F. In vivo imaging of cortical interneurons migrating in the
intermediate/subventricular zones. *Neurosci Res* **110**, 68-71,
doi:10.1016/j.neures.2016.03.005 (2016).
- 191 Deck, M. *et al.* Pathfinding of corticothalamic axons relies on a rendezvous with thalamic
projections. *Neuron* **77**, 472-484, doi:10.1016/j.neuron.2012.11.031 (2013).
- 192 McManus, M. F., Nasrallah, I. M., Gopal, P. P., Baek, W. S. & Golden, J. A. Axon mediated
interneuron migration. *J Neuropathol Exp Neurol* **63**, 932-941 (2004).
- 193 Denaxa, M., Chan, C. H., Schachner, M., Parnavelas, J. G. & Karagogeos, D. The adhesion
molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence
along the corticofugal fiber system. *Development* **128**, 4635-4644 (2001).
- 194 Jones, L., Lopez-Bendito, G., Gruss, P., Stoykova, A. & Molnar, Z. Pax6 is required for the
normal development of the forebrain axonal connections. *Development* **129**, 5041-5052
(2002).

- 195 Wiencken-Barger, A. E., Mavity-Hudson, J., Bartsch, U., Schachner, M. & Casagrande, V. A. The role of L1 in axon pathfinding and fasciculation. *Cereb Cortex* **14**, 121-131 (2004).
- 196 Morante-Oria, J. *et al.* Subpallial origin of a population of projecting pioneer neurons during corticogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12468-12473, doi:10.1073/pnas.1633692100 (2003).
- 197 Denaxa, M. *et al.* The adhesion molecule TAG-1 is required for proper migration of the superficial migratory stream in the medulla but not of cortical interneurons. *Dev Biol* **288**, 87-99, doi:10.1016/j.ydbio.2005.09.021 (2005).
- 198 Lopez-Bendito, G. & Molnar, Z. Thalamocortical development: how are we going to get there? *Nat Rev Neurosci* **4**, 276-289, doi:10.1038/nrn1075 (2003).
- 199 Metin, C. & Godement, P. The ganglionic eminence may be an intermediate target for corticofugal and thalamocortical axons. *J Neurosci* **16**, 3219-3235 (1996).
- 200 Zechel, S., Nakagawa, Y. & Ibanez, C. F. Thalamo-cortical axons regulate the radial dispersion of neocortical GABAergic interneurons. *Elife* **5**, doi:10.7554/eLife.20770 (2016).
- 201 Killen, A. C. *et al.* Protective role of Cadherin 13 in interneuron development. *Brain Struct Funct*, doi:10.1007/s00429-017-1418-y (2017).
- 202 Poluch, S. & Juliano, S. L. A normal radial glial scaffold is necessary for migration of interneurons during neocortical development. *Glia* **55**, 822-830, doi:10.1002/glia.20488 (2007).
- 203 Marin, O., Valiente, M., Ge, X. & Tsai, L. H. Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a001834, doi:10.1101/cshperspect.a001834 (2010).
- 204 Marillat, V. *et al.* Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. *J Comp Neurol* **442**, 130-155 (2002).
- 205 Zimmer, G. *et al.* Ephrin-A5 acts as a repulsive cue for migrating cortical interneurons. *Eur J Neurosci* **28**, 62-73, doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06320.x (2008).
- 206 Hamasaki, T., Goto, S., Nishikawa, S. & Ushio, Y. Neuronal cell migration for the developmental formation of the mammalian striatum. *Brain Res Brain Res Rev* **41**, 1-12 (2003).
- 207 Flanagan, J. G. & Vanderhaeghen, P. The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* **21**, 309-345, doi:10.1146/annurev.neuro.21.1.309 (1998).
- 208 Cramer, K. S. & Gabriele, M. L. Axon guidance in the auditory system: multiple functions of Eph receptors. *Neuroscience* **277**, 152-162, doi:10.1016/j.neuroscience.2014.06.068 (2014).
- 209 Powell, E. M., Mars, W. M. & Levitt, P. Hepatocyte growth factor/scatter factor is a motogen for interneurons migrating from the ventral to dorsal telencephalon. *Neuron* **30**, 79-89 (2001).
- 210 Pozas, E. & Ibanez, C. F. GDNF and GFRalpha1 promote differentiation and tangential migration of cortical GABAergic neurons. *Neuron* **45**, 701-713, doi:10.1016/j.neuron.2005.01.043 (2005).
- 211 Rudolph, J., Zimmer, G., Steinecke, A., Barchmann, S. & Bolz, J. Ephrins guide migrating cortical interneurons in the basal telencephalon. *Cell Adh Migr* **4**, 400-408 (2010).
- 212 Steinecke, A., Gampe, C., Zimmer, G., Rudolph, J. & Bolz, J. EphA/ephrin A reverse signaling promotes the migration of cortical interneurons from the medial ganglionic eminence. *Development* **141**, 460-471, doi:10.1242/dev.101691 (2014).
- 213 Canty, A. J. *et al.* Regionalized loss of parvalbumin interneurons in the cerebral cortex of mice with deficits in GFRalpha1 signaling. *J Neurosci* **29**, 10695-10705, doi:10.1523/JNEUROSCI.2658-09.2009 (2009).
- 214 Bernalov, M. M. *et al.* Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin. *J Cell Biol* **192**, 153-169, doi:10.1083/jcb.201009136 (2011).
- 215 Carmona, M. A. *et al.* Age-dependent spontaneous hyperexcitability and impairment of GABAergic function in the hippocampus of mice lacking trkB. *Cereb Cortex* **16**, 47-63, doi:10.1093/cercor/bhi083 (2006).
- 216 Sanchez-Huertas, C. & Rico, B. CREB-Dependent Regulation of GAD65 Transcription by BDNF/TrkB in Cortical Interneurons. *Cereb Cortex* **21**, 777-788, doi:10.1093/cercor/bhq150 (2011).
- 217 Perrinjaquet, M. *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. *J Cell Sci* **124**, 2797-2805, doi:10.1242/jcs.083717 (2011).
- 218 Zimmer, G. *et al.* Bidirectional ephrinB3/EphA4 signaling mediates the segregation of medial ganglionic eminence- and preoptic area-derived interneurons in the deep and superficial migratory stream. *J Neurosci* **31**, 18364-18380, doi:10.1523/JNEUROSCI.4690-11.2011 (2011).

- 219 Marin, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M. & Rubenstein, J. L. Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* **293**, 872-875, doi:10.1126/science.1061891 (2001).
- 220 Nobrega-Pereira, S. *et al.* Postmitotic Nkx2-1 controls the migration of telencephalic interneurons by direct repression of guidance receptors. *Neuron* **59**, 733-745, doi:10.1016/j.neuron.2008.07.024 (2008).
- 221 Gant, J. C. *et al.* Decreased number of interneurons and increased seizures in neuropilin 2 deficient mice: implications for autism and epilepsy. *Epilepsia* **50**, 629-645, doi:10.1111/j.1528-1167.2008.01725.x (2009).
- 222 Le, T. N. *et al.* Dlx homeobox genes promote cortical interneuron migration from the basal forebrain by direct repression of the semaphorin receptor neuropilin-2. *J Biol Chem* **282**, 19071-19081, doi:10.1074/jbc.M607486200 (2007).
- 223 Hernandez-Miranda, L. R. *et al.* Robo1 regulates semaphorin signaling to guide the migration of cortical interneurons through the ventral forebrain. *J Neurosci* **31**, 6174-6187, doi:10.1523/JNEUROSCI.5464-10.2011 (2011).
- 224 Zimmer, G. *et al.* Chondroitin sulfate acts in concert with semaphorin 3A to guide tangential migration of cortical interneurons in the ventral telencephalon. *Cereb Cortex* **20**, 2411-2422, doi:10.1093/cercor/bhp309 (2010).
- 225 van den Berghe, V. *et al.* Directed migration of cortical interneurons depends on the cell-autonomous action of Sip1. *Neuron* **77**, 70-82, doi:10.1016/j.neuron.2012.11.009 (2013).
- 226 McKinsey, G. L. *et al.* Dlx1&2-dependent expression of Zfhx1b (Sip1, Zeb2) regulates the fate switch between cortical and striatal interneurons. *Neuron* **77**, 83-98, doi:10.1016/j.neuron.2012.11.035 (2013).
- 227 Wichterle, H., Alvarez-Dolado, M., Erskine, L. & Alvarez-Buylla, A. Permissive corridor and diffusible gradients direct medial ganglionic eminence cell migration to the neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 727-732, doi:10.1073/pnas.242721899 (2003).
- 228 Rakic, S. *et al.* Cdk5 phosphorylation of ErbB4 is required for tangential migration of cortical interneurons. *Cereb Cortex* **25**, 991-1003, doi:10.1093/cercor/bht290 (2015).
- 229 Flames, N. *et al.* Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* **44**, 251-261, doi:10.1016/j.neuron.2004.09.028 (2004).
- 230 Yau, H. J., Wang, H. F., Lai, C. & Liu, F. C. Neural development of the neuregulin receptor ErbB4 in the cerebral cortex and the hippocampus: preferential expression by interneurons tangentially migrating from the ganglionic eminences. *Cereb Cortex* **13**, 252-264 (2003).
- 231 Fisahn, A., Neddens, J., Yan, L. & Buonanno, A. Neuregulin-1 modulates hippocampal gamma oscillations: implications for schizophrenia. *Cereb Cortex* **19**, 612-618, doi:10.1093/cercor/bhn107 (2009).
- 232 Liapi, A. *et al.* Stromal-derived factor 1 signalling regulates radial and tangential migration in the developing cerebral cortex. *Dev Neurosci* **30**, 117-131, doi:10.1159/000109857 (2008).
- 233 Li, G. *et al.* Regional distribution of cortical interneurons and development of inhibitory tone are regulated by Cxcl12/Cxcr4 signaling. *J Neurosci* **28**, 1085-1098, doi:10.1523/JNEUROSCI.4602-07.2008 (2008).
- 234 Tamamaki, N., Fujimori, K., Nojyo, Y., Kaneko, T. & Takauji, R. Evidence that Sema3A and Sema3F regulate the migration of GABAergic neurons in the developing neocortex. *J Comp Neurol* **455**, 238-248, doi:10.1002/cne.10476 (2003).
- 235 Lopez-Bendito, G. *et al.* Chemokine signaling controls intracortical migration and final distribution of GABAergic interneurons. *J Neurosci* **28**, 1613-1624, doi:10.1523/JNEUROSCI.4651-07.2008 (2008).
- 236 Tham, T. N. *et al.* Developmental pattern of expression of the alpha chemokine stromal cell-derived factor 1 in the rat central nervous system. *Eur J Neurosci* **13**, 845-856 (2001).
- 237 Stumm, R. & Holtt, V. CXC chemokine receptor 4 regulates neuronal migration and axonal pathfinding in the developing nervous system: implications for neuronal regeneration in the adult brain. *J Mol Endocrinol* **38**, 377-382, doi:10.1677/JME-06-0032 (2007).
- 238 Stumm, R., Kolodziej, A., Schulz, S., Kohtz, J. D. & Holtt, V. Patterns of SDF-1alpha and SDF-1gamma mRNAs, migration pathways, and phenotypes of CXCR4-expressing neurons in the developing rat telencephalon. *J Comp Neurol* **502**, 382-399, doi:10.1002/cne.21336 (2007).
- 239 Stumm, R. K. *et al.* CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *J Neurosci* **23**, 5123-5130 (2003).
- 240 Daniel, D., Rossel, M., Seki, T. & Konig, N. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) expression in embryonic mouse cerebral cortex starts in the intermediate zone close to the pallial-subpallial

- boundary and extends progressively towards the cortical hem. *Gene Expr Patterns* **5**, 317-322, doi:10.1016/j.modgep.2004.10.007 (2005).
- 241 Tiveron, M. C. *et al.* Molecular interaction between projection neuron precursors and invading interneurons via stromal-derived factor 1 (CXCL12)/CXCR4 signaling in the cortical subventricular zone/intermediate zone. *J Neurosci* **26**, 13273-13278, doi:10.1523/JNEUROSCI.4162-06.2006 (2006).
- 242 Sessa, A. *et al.* Tbr2-positive intermediate (basal) neuronal progenitors safeguard cerebral cortex expansion by controlling amplification of pallial glutamatergic neurons and attraction of subpallial GABAergic interneurons. *Genes Dev* **24**, 1816-1826, doi:10.1101/gad.575410 (2010).
- 243 Zarbalis, K., Choe, Y., Siegenthaler, J. A., Orosco, L. A. & Pleasure, S. J. Meningeal defects alter the tangential migration of cortical interneurons in Foxc1hith/hith mice. *Neural Dev* **7**, 2, doi:10.1186/1749-8104-7-2 (2012).
- 244 Sanchez-Alcaniz, J. A. *et al.* Cxcr7 controls neuronal migration by regulating chemokine responsiveness. *Neuron* **69**, 77-90, doi:10.1016/j.neuron.2010.12.006 (2011).
- 245 Wang, Y. *et al.* CXCR4 and CXCR7 have distinct functions in regulating interneuron migration. *Neuron* **69**, 61-76, doi:10.1016/j.neuron.2010.12.005 (2011).
- 246 Lysko, D. E., Putt, M. & Golden, J. A. SDF1 regulates leading process branching and speed of migrating interneurons. *J Neurosci* **31**, 1739-1745, doi:10.1523/JNEUROSCI.3118-10.2011 (2011).
- 247 Caronia-Brown, G. & Grove, E. A. Timing of cortical interneuron migration is influenced by the cortical hem. *Cereb Cortex* **21**, 748-755, doi:10.1093/cercor/bhq142 (2011).
- 248 Tanaka, D. H. *et al.* CXCR4 is required for proper regional and laminar distribution of cortical somatostatin-, calretinin-, and neuropeptide Y-expressing GABAergic interneurons. *Cereb Cortex* **20**, 2810-2817, doi:10.1093/cercor/bhq027 (2010).
- 249 Abe, P. *et al.* CXCR7 prevents excessive CXCL12-mediated downregulation of CXCR4 in migrating cortical interneurons. *Development* **141**, 1857-1863, doi:10.1242/dev.104224 (2014).
- 250 Sang, Q., Wu, J., Rao, Y., Hsueh, Y. P. & Tan, S. S. Slit promotes branching and elongation of neurites of interneurons but not projection neurons from the developing telencephalon. *Mol Cell Neurosci* **21**, 250-265 (2002).
- 251 Andrews, W. *et al.* Robo1 regulates the development of major axon tracts and interneuron migration in the forebrain. *Development* **133**, 2243-2252, doi:10.1242/dev.02379 (2006).
- 252 Barber, M. *et al.* The role of Robo3 in the development of cortical interneurons. *Cereb Cortex* **19 Suppl 1**, i22-31, doi:10.1093/cercor/bhp041 (2009).
- 253 Behar, T. N., Schaffner, A. E., Scott, C. A., Greene, C. L. & Barker, J. L. GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex. *Cereb Cortex* **10**, 899-909 (2000).
- 254 Cuzon, V. C., Yeh, P. W., Cheng, Q. & Yeh, H. H. Ambient GABA promotes cortical entry of tangentially migrating cells derived from the medial ganglionic eminence. *Cereb Cortex* **16**, 1377-1388, doi:10.1093/cercor/bhj084 (2006).
- 255 Manent, J. B., Jorquera, I., Ben-Ari, Y., Aniksztejn, L. & Represa, A. Glutamate acting on AMPA but not NMDA receptors modulates the migration of hippocampal interneurons. *J Neurosci* **26**, 5901-5909, doi:10.1523/JNEUROSCI.1033-06.2006 (2006).
- 256 Bortone, D. & Polleux, F. KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron* **62**, 53-71, doi:10.1016/j.neuron.2009.01.034 (2009).
- 257 Inada, H. *et al.* GABA regulates the multidirectional tangential migration of GABAergic interneurons in living neonatal mice. *PLoS One* **6**, e27048, doi:10.1371/journal.pone.0027048 (2011).
- 258 Soria, J. M., Martinez-Galan, J. R., Lujan, R., Valdeolmillos, M. & Fairen, A. Functional NMDA and GABA receptors in pioneer neurons of the cortical marginal zone. *Eur J Neurosci* **11**, 3351-3354 (1999).
- 259 Metin, C., Denizot, J. P. & Ropert, N. Intermediate zone cells express calcium-permeable AMPA receptors and establish close contact with growing axons. *J Neurosci* **20**, 696-708 (2000).
- 260 Crandall, J. E. *et al.* Dopamine receptor activation modulates GABA neuron migration from the basal forebrain to the cerebral cortex. *J Neurosci* **27**, 3813-3822, doi:10.1523/JNEUROSCI.5124-06.2007 (2007).

- 261 Luhmann, H. J., Fukuda, A. & Kilb, W. Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. *Front Cell Neurosci* **9**, 4, doi:10.3389/fncel.2015.00004 (2015).
- 262 Avila, A. *et al.* Glycine receptor alpha2 subunit activation promotes cortical interneuron migration. *Cell Rep* **4**, 738-750, doi:10.1016/j.celrep.2013.07.016 (2013).
- 263 Yozu, M., Tabata, H., Konig, N. & Nakajima, K. Migratory behavior of presumptive interneurons is affected by AMPA receptor activation in slice cultures of embryonic mouse neocortex. *Dev Neurosci* **30**, 105-116, doi:10.1159/000109856 (2008).
- 264 Lopez-Bendito, G. *et al.* Blockade of GABA(B) receptors alters the tangential migration of cortical neurons. *Cereb Cortex* **13**, 932-942 (2003).
- 265 Britto, J. M., Obata, K., Yanagawa, Y. & Tan, S. S. Migratory response of interneurons to different regions of the developing neocortex. *Cereb Cortex* **16 Suppl 1**, i57-63, doi:10.1093/cercor/bhj173 (2006).
- 266 Stanco, A. *et al.* Netrin-1-alpha3beta1 integrin interactions regulate the migration of interneurons through the cortical marginal zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 7595-7600, doi:10.1073/pnas.0811343106 (2009).
- 267 Antypa, M., Faux, C., Eichele, G., Parnavelas, J. G. & Andrews, W. D. Differential gene expression in migratory streams of cortical interneurons. *Eur J Neurosci* **34**, 1584-1594, doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07896.x (2011).
- 268 Bellion, A., Baudoin, J. P., 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* **25**, 5691-5699, doi:10.1523/JNEUROSCI.1030-05.2005 (2005).
- 269 Yanagida, M., Miyoshi, R., Toyokuni, R., Zhu, Y. & Murakami, F. Dynamics of the leading process, nucleus, and Golgi apparatus of migrating cortical interneurons in living mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 16737-16742, doi:10.1073/pnas.1209166109 (2012).
- 270 Baudoin, J. P. *et al.* Tangentially migrating neurons assemble a primary cilium that promotes their reorientation to the cortical plate. *Neuron* **76**, 1108-1122, doi:10.1016/j.neuron.2012.10.027 (2012).
- 271 Caspary, T., Larkins, C. E. & Anderson, K. V. The graded response to Sonic Hedgehog depends on cilia architecture. *Dev Cell* **12**, 767-778, doi:10.1016/j.devcel.2007.03.004 (2007).
- 272 Higginbotham, H. *et al.* Arl13b in primary cilia regulates the migration and placement of interneurons in the developing cerebral cortex. *Dev Cell* **23**, 925-938, doi:10.1016/j.devcel.2012.09.019 (2012).
- 273 Friocourt, G. *et al.* Both doublecortin and doublecortin-like kinase play a role in cortical interneuron migration. *J Neurosci* **27**, 3875-3883, doi:10.1523/JNEUROSCI.4530-06.2007 (2007).
- 274 Zhou, Y., Gunput, R. A. & Pasterkamp, R. J. Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci* **33**, 161-170, doi:10.1016/j.tibs.2008.01.006 (2008).
- 275 Uchida, Y. *et al.* Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3beta phosphorylation of CRMP2: implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. *Genes Cells* **10**, 165-179, doi:10.1111/j.1365-2443.2005.00827.x (2005).
- 276 Steinecke, A., Gampe, C., Nitsche, F. & Bolz, J. DISC1 knockdown impairs the tangential migration of cortical interneurons by affecting the actin cytoskeleton. *Front Cell Neurosci* **8**, 190, doi:10.3389/fncel.2014.00190 (2014).
- 277 Steinecke, A., Gampe, C., Valkova, C., Kaether, C. & Bolz, J. Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) is necessary for the correct migration of cortical interneurons. *J Neurosci* **32**, 738-745, doi:10.1523/JNEUROSCI.5036-11.2012 (2012).
- 278 Schaar, B. T. & McConnell, S. K. Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13652-13657, doi:10.1073/pnas.0506008102 (2005).
- 279 Britto, J. M., Johnston, L. A. & Tan, S. S. The stochastic search dynamics of interneuron migration. *Biophys J* **97**, 699-709, doi:10.1016/j.bpj.2009.04.064 (2009).
- 280 Umeshima, H., Hirano, T. & Kengaku, M. Microtubule-based nuclear movement occurs independently of centrosome positioning in migrating neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16182-16187, doi:10.1073/pnas.0708047104 (2007).
- 281 Shinohara, R. *et al.* A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in tangential migration of interneuron precursors. *Nat Neurosci* **15**, 373-380, S371-372, doi:10.1038/nn.3020 (2012).
- 282 Vastrik, I., Eickholt, B. J., Walsh, F. S., Ridley, A. & Doherty, P. Sema3A-induced growth-cone collapse is mediated by Rac1 amino acids 17-32. *Curr Biol* **9**, 991-998 (1999).

- 283 Nakamura, F., Kalb, R. G. & Strittmatter, S. M. Molecular basis of semaphorin-mediated axon
guidance. *J Neurobiol* **44**, 219-229 (2000).
- 284 Aizawa, H. *et al.* Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-
induced growth cone collapse. *Nat Neurosci* **4**, 367-373, doi:10.1038/86011 (2001).
- 285 Liu, B. P. & Strittmatter, S. M. Semaphorin-mediated axonal guidance via Rho-related G
proteins. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 619-626 (2001).
- 286 Swiercz, J. M., Kuner, R., Behrens, J. & Offermanns, S. Plexin-B1 directly interacts with PDZ-
RhoGEF/LARG to regulate RhoA and growth cone morphology. *Neuron* **35**, 51-63 (2002).
- 287 Peyre, E., Silva, C. G. & Nguyen, L. Crosstalk between intracellular and extracellular signals
regulating interneuron production, migration and integration into the cortex. *Front Cell
Neurosci* **9**, 129, doi:10.3389/fncel.2015.00129 (2015).
- 288 Bai, J. *et al.* RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat
Neurosci* **6**, 1277-1283, doi:10.1038/nn1153 (2003).
- 289 Kappeler, C. *et al.* Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from
doublecortin knockout mice. *Hum Mol Genet* **15**, 1387-1400, doi:10.1093/hmg/ddl062 (2006).
- 290 Reiner, O. LIS1 and DCX: Implications for Brain Development and Human Disease in Relation
to Microtubules. *Scientifica (Cairo)* **2013**, 393975, doi:10.1155/2013/393975 (2013).
- 291 Rakic, S. *et al.* Cortical interneurons require p35/Cdk5 for their migration and laminar
organization. *Cereb Cortex* **19**, 1857-1869, doi:10.1093/cercor/bhn213 (2009).
- 292 Colasante, G. *et al.* Arx is a direct target of Dlx2 and thereby contributes to the tangential
migration of GABAergic interneurons. *J Neurosci* **28**, 10674-10686,
doi:10.1523/JNEUROSCI.1283-08.2008 (2008).
- 293 Evsyukova, I., Plestant, C. & Anton, E. S. Integrative mechanisms of oriented neuronal
migration in the developing brain. *Annu Rev Cell Dev Biol* **29**, 299-353, doi:10.1146/annurev-
cellbio-101512-122400 (2013).
- 294 Ohshima, T. *et al.* Cdk5 is required for multipolar-to-bipolar transition during radial neuronal
migration and proper dendrite development of pyramidal neurons in the cerebral cortex.
Development **134**, 2273-2282, doi:10.1242/dev.02854 (2007).
- 295 Nasrallah, I. M., McManus, M. F., Pancoast, M. M., Wynshaw-Boris, A. & Golden, J. A.
Analysis of non-radial interneuron migration dynamics and its disruption in Lis1+/- mice. *J
Comp Neurol* **496**, 847-858, doi:10.1002/cne.20966 (2006).
- 296 Cobos, I., Borello, U. & Rubenstein, J. L. Dlx transcription factors promote migration through
repression of axon and dendrite growth. *Neuron* **54**, 873-888,
doi:10.1016/j.neuron.2007.05.024 (2007).
- 297 Tsai, J. W., Bremner, K. H. & Vallee, R. B. Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial
neuronal migration in live brain tissue. *Nat Neurosci* **10**, 970-979, doi:10.1038/nn1934 (2007).
- 298 Kawauchi, T. & Hoshino, M. Molecular pathways regulating cytoskeletal organization and
morphological changes in migrating neurons. *Dev Neurosci* **30**, 36-46, doi:10.1159/000109850
(2008).
- 299 Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y. & Hoshino, M. Cdk5 phosphorylates and stabilizes
p27kip1 contributing to actin organization and cortical neuronal migration. *Nat Cell Biol* **8**, 17-
26, doi:10.1038/ncb1338 (2006).
- 300 Nikolic, M., Chou, M. M., Lu, W., Mayer, B. J. & Tsai, L. H. The p35/Cdk5 kinase is a neuron-
specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature* **395**, 194-198, doi:10.1038/26034
(1998).
- 301 Gopal, P. P., Simonet, J. C., Shapiro, W. & Golden, J. A. Leading process branch instability in
Lis1+/- nonradially migrating interneurons. *Cereb Cortex* **20**, 1497-1505,
doi:10.1093/cercor/bhp211 (2010).
- 302 Myers, A. K., Meechan, D. W., Adney, D. R. & Tucker, E. S. Cortical interneurons require Jnk1
to enter and navigate the developing cerebral cortex. *J Neurosci* **34**, 7787-7801,
doi:10.1523/JNEUROSCI.4695-13.2014 (2014).
- 303 Alifragis, P., Liapi, A. & Parnavelas, J. G. Lhx6 regulates the migration of cortical interneurons
from the ventral telencephalon but does not specify their GABA phenotype. *J Neurosci* **24**,
5643-5648, doi:10.1523/JNEUROSCI.1245-04.2004 (2004).
- 304 Friocourt, G. *et al.* Cell-autonomous roles of ARX in cell proliferation and neuronal migration
during corticogenesis. *J Neurosci* **28**, 5794-5805, doi:10.1523/JNEUROSCI.1067-08.2008
(2008).
- 305 Wang, X. J. Neurophysiological and computational principles of cortical rhythms in cognition.
Physiol Rev **90**, 1195-1268, doi:10.1152/physrev.00035.2008 (2010).

- 306 Vogt, D. *et al.* Lhx6 directly regulates Arx and CXCR7 to determine cortical interneuron fate and laminar position. *Neuron* **82**, 350-364, doi:10.1016/j.neuron.2014.02.030 (2014).
- 307 Marsh, E. D. *et al.* Developmental interneuron subtype deficits after targeted loss of Arx. *BMC Neurosci* **17**, 35, doi:10.1186/s12868-016-0265-8 (2016).
- 308 Elias, L. A., Potter, G. B. & Kriegstein, A. R. A time and a place for nkx2-1 in interneuron specification and migration. *Neuron* **59**, 679-682, doi:10.1016/j.neuron.2008.08.017 (2008).
- 309 Koser, D. E. *et al.* Mechanosensing is critical for axon growth in the developing brain. *Nat Neurosci* **19**, 1592-1598, doi:10.1038/nn.4394 (2016).
- 310 DeMali, K. A., Sun, X. & Bui, G. A. Force transmission at cell-cell and cell-matrix adhesions. *Biochemistry* **53**, 7706-7717, doi:10.1021/bi501181p (2014).
- 311 Leckband, D. E., le Duc, Q., Wang, N. & de Rooij, J. Mechanotransduction at cadherin-mediated adhesions. *Curr Opin Cell Biol* **23**, 523-530, doi:10.1016/j.ceb.2011.08.003 (2011).
- 312 Sullivan, C. S., Kumper, M., Temple, B. S. & Maness, P. F. The Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) Promotes Clustering and Activation of EphA3 Receptors in GABAergic Interneurons to Induce Ras Homolog Gene Family, Member A (RhoA)/Rho-associated protein kinase (ROCK)-mediated Growth Cone Collapse. *J Biol Chem* **291**, 26262-26272, doi:10.1074/jbc.M116.760017 (2016).
- 313 Solecki, D. J. Sticky situations: recent advances in control of cell adhesion during neuronal migration. *Curr Opin Neurobiol* **22**, 791-798, doi:10.1016/j.conb.2012.04.010 (2012).
- 314 Fukata, M. & Kaibuchi, K. Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 887-897, doi:10.1038/35103068 (2001).
- 315 Inamura, N. *et al.* Intrinsic and extrinsic mechanisms control the termination of cortical interneuron migration. *J Neurosci* **32**, 6032-6042, doi:10.1523/JNEUROSCI.3446-11.2012 (2012).
- 316 Bartolini, G., Ciceri, G. & Marin, O. Integration of GABAergic interneurons into cortical cell assemblies: lessons from embryos and adults. *Neuron* **79**, 849-864, doi:10.1016/j.neuron.2013.08.014 (2013).
- 317 Barber, M. & Pierani, A. Tangential migration of glutamatergic neurons and cortical patterning during development: Lessons from Cajal-Retzius cells. *Dev Neurobiol* **76**, 847-881, doi:10.1002/dneu.22363 (2016).
- 318 Hevner, R. F., Daza, R. A., 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* **124**, 605-618, doi:10.1016/j.neuroscience.2003.11.033 (2004).
- 319 Yabut, O. *et al.* Abnormal laminar position and dendrite development of interneurons in the reeler forebrain. *Brain Res* **1140**, 75-83, doi:10.1016/j.brainres.2005.09.070 (2007).
- 320 Elias, L. A., Turmaine, M., Parnavelas, J. G. & Kriegstein, A. R. Connexin 43 mediates the tangential to radial migratory switch in ventrally derived cortical interneurons. *J Neurosci* **30**, 7072-7077, doi:10.1523/JNEUROSCI.5728-09.2010 (2010).
- 321 Elias, L. A., Wang, D. D. & Kriegstein, A. R. Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* **448**, 901-907, doi:10.1038/nature06063 (2007).
- 322 Bartolini, G. *et al.* Neuregulin 3 Mediates Cortical Plate Invasion and Laminar Allocation of GABAergic Interneurons. *Cell Rep* **18**, 1157-1170, doi:10.1016/j.celrep.2016.12.089 (2017).
- 323 Pla, R., Borrell, V., Flames, N. & Marin, O. Layer acquisition by cortical GABAergic interneurons is independent of Reelin signaling. *J Neurosci* **26**, 6924-6934, doi:10.1523/JNEUROSCI.0245-06.2006 (2006).
- 324 Ben-Ari, Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* **3**, 728-739, doi:10.1038/nrn920 (2002).
- 325 De Marco Garcia, N. V., Karayannis, T. & Fishell, G. Neuronal activity is required for the development of specific cortical interneuron subtypes. *Nature* **472**, 351-355, doi:10.1038/nature09865 (2011).
- 326 de Lima, A. D., Gieseler, A. & Voigt, T. Relationship between GABAergic interneurons migration and early neocortical network activity. *Dev Neurobiol* **69**, 105-123, doi:10.1002/dneu.20696 (2009).
- 327 Galarreta, M. & Hestrin, S. Electrical and chemical synapses among parvalbumin fast-spiking GABAergic interneurons in adult mouse neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12438-12443, doi:10.1073/pnas.192159599 (2002).
- 328 Galarreta, M. & Hestrin, S. A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature* **402**, 72-75, doi:10.1038/47029 (1999).
- 329 Gibson, J. R., Beierlein, M. & Connors, B. W. Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature* **402**, 75-79, doi:10.1038/47035 (1999).

- 330 Deng, R., Kao, J. P. Y. & Kanold, P. O. Distinct Translaminar Glutamatergic Circuits to GABAergic Interneurons in the Neonatal Auditory Cortex. *Cell Rep* **19**, 1141-1150, doi:10.1016/j.celrep.2017.04.044 (2017).
- 331 Nikolic, M., Gardner, H. A. & Tucker, K. L. Postnatal neuronal apoptosis in the cerebral cortex: physiological and pathophysiological mechanisms. *Neuroscience* **254**, 369-378, doi:10.1016/j.neuroscience.2013.09.035 (2013).
- 332 Southwell, D. G. *et al.* Intrinsically determined cell death of developing cortical interneurons. *Nature* **491**, 109-113, doi:10.1038/nature11523 (2012).
- 333 Hansen, D. V., Lui, J. H., Parker, P. R. & Kriegstein, A. R. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* **464**, 554-561, doi:10.1038/nature08845 (2010).
- 334 Dehay, C., Kennedy, H. & Kosik, K. S. The outer subventricular zone and primate-specific cortical complexification. *Neuron* **85**, 683-694, doi:10.1016/j.neuron.2014.12.060 (2015).
- 335 Molnar, Z. *et al.* Comparative aspects of cerebral cortical development. *Eur J Neurosci* **23**, 921-934, doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04611.x (2006).
- 336 Smart, I. H., Dehay, C., Giroud, P., Berland, M. & Kennedy, H. Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. *Cereb Cortex* **12**, 37-53 (2002).
- 337 Petanjek, Z., Berger, B. & Esclapez, M. Origins of cortical GABAergic neurons in the cynomolgus monkey. *Cereb Cortex* **19**, 249-262, doi:10.1093/cercor/bhn078 (2009).
- 338 Hendry, S. H., Schwark, H. D., Jones, E. G. & Yan, J. Numbers and proportions of GABA-immunoreactive neurons in different areas of monkey cerebral cortex. *J Neurosci* **7**, 1503-1519 (1987).
- 339 Beaulieu, C., Kisvarday, Z., Somogyi, P., Cynader, M. & Cowey, A. Quantitative distribution of GABA-immunopositive and -immunonegative neurons and synapses in the monkey striate cortex (area 17). *Cereb Cortex* **2**, 295-309 (1992).
- 340 del Rio, M. R. & DeFelipe, J. Colocalization of calbindin D-28k, calretinin, and GABA immunoreactivities in neurons of the human temporal cortex. *J Comp Neurol* **369**, 472-482, doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960603)369:3<472::AID-CNE11>3.0.CO;2-K (1996).
- 341 Gabbott, P. L. & Bacon, S. J. Local circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 25 and 32) in the monkey: II. Quantitative areal and laminar distributions. *J Comp Neurol* **364**, 609-636, doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960122)364:4<609::AID-CNE2>3.0.CO;2-7 (1996).
- 342 Gabbott, P. L. & Bacon, S. J. Local circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 25 and 32) in the monkey: I. Cell morphology and morphometrics. *J Comp Neurol* **364**, 567-608, doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960122)364:4<567::AID-CNE1>3.0.CO;2-1 (1996).
- 343 Gabbott, P. L., Jays, P. R. & Bacon, S. J. Calretinin neurons in human medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 32', and 25). *J Comp Neurol* **381**, 389-410 (1997).
- 344 Petanjek, Z., Kostovic, I. & Esclapez, M. Primate-specific origins and migration of cortical GABAergic neurons. *Front Neuroanat* **3**, 26, doi:10.3389/neuro.05.026.2009 (2009).
- 345 Letinic, K., Zoncu, R. & Rakic, P. Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature* **417**, 645-649, doi:10.1038/nature00779 (2002).
- 346 Pollen, A. A. *et al.* Molecular identity of human outer radial glia during cortical development. *Cell* **163**, 55-67, doi:10.1016/j.cell.2015.09.004 (2015).
- 347 Zecevic, N., Hu, F. & Jakovcevski, I. Interneurons in the developing human neocortex. *Dev Neurobiol* **71**, 18-33, doi:10.1002/dneu.20812 (2011).
- 348 Yu, X. & Zecevic, N. Dorsal radial glial cells have the potential to generate cortical interneurons in human but not in mouse brain. *J Neurosci* **31**, 2413-2420, doi:10.1523/JNEUROSCI.5249-10.2011 (2011).
- 349 Ma, T. *et al.* Subcortical origins of human and monkey neocortical interneurons. *Nat Neurosci* **16**, 1588-1597, doi:10.1038/nn.3536 (2013).
- 350 Molnar, Z. & Clowry, G. Cerebral cortical development in rodents and primates. *Prog Brain Res* **195**, 45-70, doi:10.1016/B978-0-444-53860-4.00003-9 (2012).
- 351 Molnar, Z. & Butt, S. J. Best-laid schemes for interneuron origin of mice and men. *Nat Neurosci* **16**, 1512-1514, doi:10.1038/nn.3557 (2013).
- 352 Paredes, M. F. *et al.* Extensive migration of young neurons into the infant human frontal lobe. *Science* **354**, doi:10.1126/science.aaf7073 (2016).
- 353 Redies, C., Hertel, N. & Hubner, C. A. Cadherins and neuropsychiatric disorders. *Brain Res* **1470**, 130-144, doi:10.1016/j.brainres.2012.06.020 (2012).

- 354 Hirabayashi, T. & Yagi, T. Protocadherins in neurological diseases. *Adv Neurobiol* **8**, 293-314 (2014).
- 355 Terracciano, A. *et al.* Genome-wide association scan for five major dimensions of personality. *Mol Psychiatry* **15**, 647-656, doi:10.1038/mp.2008.113 (2010).
- 356 Dammeyer, J. Children with Usher syndrome: mental and behavioral disorders. *Behav Brain Funct* **8**, 16, doi:10.1186/1744-9081-8-16 (2012).
- 357 Oikkonen, J. *et al.* A genome-wide linkage and association study of musical aptitude identifies loci containing genes related to inner ear development and neurocognitive functions. *Mol Psychiatry* **20**, 275-282, doi:10.1038/mp.2014.8 (2015).
- 358 Nakayama, J. *et al.* A nonsense mutation of the MASS1 gene in a family with febrile and afebrile seizures. *Ann Neurol* **52**, 654-657, doi:10.1002/ana.10347 (2002).
- 359 Lin, Y. C., Frei, J. A., Kilander, M. B., Shen, W. & Blatt, G. J. A Subset of Autism-Associated Genes Regulate the Structural Stability of Neurons. *Front Cell Neurosci* **10**, 263, doi:10.3389/fncel.2016.00263 (2016).
- 360 Georgieva, L. *et al.* Genetic variation in the seven-pass transmembrane cadherin CELSR1: lack of association with schizophrenia. *Psychiatr Genet* **13**, 103-106, doi:10.1097/01.ypg.0000057486.14812.03 (2003).
- 361 Butler, M. G., Rafi, S. K., Hossain, W., Stephan, D. A. & Manzardo, A. M. Whole exome sequencing in females with autism implicates novel and candidate genes. *Int J Mol Sci* **16**, 1312-1335, doi:10.3390/ijms16011312 (2015).
- 362 Seong, E., Yuan, L. & Arikath, J. Cadherins and catenins in dendrite and synapse morphogenesis. *Cell Adh Migr* **9**, 202-213, doi:10.4161/19336918.2014.994919 (2015).
- 363 Hulpiau, P. & van Roy, F. Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 349-369, doi:10.1016/j.biocel.2008.09.027 (2009).
- 364 Gumbiner, B. M. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 622-634, doi:10.1038/nrm1699 (2005).
- 365 Hulpiau, P., Sahin Gul, I. & van Roy, F. in *The cadherin superfamily : key regulators of animal development and physiology* (eds Shintaro T. Suzuki & Shinji Hirano) (Springer, 2016).
- 366 Shapiro, L. in *The cadherin superfamily : key regulators of animal development and physiology* (eds Shintaro T. Suzuki & Shinji Hirano) (Springer, 2016).
- 367 Emond, M. R., Biswas, S., Blevins, C. J. & Jontes, J. D. A complex of Protocadherin-19 and N-cadherin mediates a novel mechanism of cell adhesion. *J Cell Biol* **195**, 1115-1121, doi:10.1083/jcb.201108115 (2011).
- 368 Brayshaw, L. L. & Price, S. R. in *The cadherin superfamily : key regulators of animal development and physiology* (eds Shintaro T. Suzuki & Shinji Hirano) (Springer, 2016).
- 369 Lelievre, E. C. *et al.* N-cadherin mediates neuronal cell survival through Bim down-regulation. *PLoS One* **7**, e33206, doi:10.1371/journal.pone.0033206 (2012).
- 370 Gartner, A., Fornasiero, E. F. & Dotti, C. G. Cadherins as regulators of neuronal polarity. *Cell Adh Migr* **9**, 175-182, doi:10.4161/19336918.2014.983808 (2015).
- 371 Lefebvre, J. L., Kostadinov, D., Chen, W. V., Maniatis, T. & Sanes, J. R. Protocadherins mediate dendritic self-avoidance in the mammalian nervous system. *Nature* **488**, 517-521, doi:10.1038/nature11305 (2012).
- 372 Basu, R., Taylor, M. R. & Williams, M. E. The classic cadherins in synaptic specificity. *Cell Adh Migr* **9**, 193-201, doi:10.1080/19336918.2014.1000072 (2015).
- 373 Luccardini, C., Leclech, C., Viou, L., Rio, J. P. & Metin, C. Cortical interneurons migrating on a pure substrate of N-cadherin exhibit fast synchronous centrosomal and nuclear movements and reduced ciliogenesis. *Front Cell Neurosci* **9**, 286, doi:10.3389/fncel.2015.00286 (2015).
- 374 Luccardini, C. *et al.* N-cadherin sustains motility and polarity of future cortical interneurons during tangential migration. *J Neurosci* **33**, 18149-18160, doi:10.1523/JNEUROSCI.0593-13.2013 (2013).
- 375 Rivero, O. *et al.* Cadherin-13, a risk gene for ADHD and comorbid disorders, impacts GABAergic function in hippocampus and cognition. *Transl Psychiatry* **5**, e655, doi:10.1038/tp.2015.152 (2015).
- 376 Hamann, J. *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIV. Adhesion G protein-coupled receptors. *Pharmacol Rev* **67**, 338-367, doi:10.1124/pr.114.009647 (2015).
- 377 Schiöth, H. B., Nordström, K. J. V. & Fredriksson, R. in *Adhesion-GPCRs structure to function, Advances in experimental medicine and biology v 706* (eds Simon Yona & Martin Stacey) 1 online resource (xxi, 199 p.) (Springer Science+Business Media ; Landes Bioscience, New York Austin, Tex., 2010).

- 378 Langenhan, T., Piao, X. & Monk, K. R. Adhesion G protein-coupled receptors in nervous system development and disease. *Nat Rev Neurosci* **17**, 550-561, doi:10.1038/nrn.2016.86 (2016).
- 379 Tissir, F., De-Backer, O., Goffinet, A. M. & Lambert de Rouvroit, C. Developmental expression profiles of Celsr (Flamingo) genes in the mouse. *Mech Dev* **112**, 157-160 (2002).
- 380 Ying, G. *et al.* The protocadherin gene Celsr3 is required for interneuron migration in the mouse forebrain. *Mol Cell Biol* **29**, 3045-3061, doi:10.1128/MCB.00011-09 (2009).
- 381 Boutin, C., Goffinet, A. M. & Tissir, F. Celsr1-3 cadherins in PCP and brain development. *Curr Top Dev Biol* **101**, 161-183, doi:10.1016/B978-0-12-394592-1.00010-7 (2012).
- 382 Shi, D., Arata, M., Usui, T., Fujimori, T. & Uemura, T. in *The cadherin superfamily : key regulators of animal development and physiology* (eds Shintaro T. Suzuki & Shinji Hirano) (Springer, 2016).
- 383 Tissir, F. & Goffinet, A. M. Atypical cadherins Celsr1-3 and planar cell polarity in vertebrates. *Prog Mol Biol Transl Sci* **116**, 193-214, doi:10.1016/B978-0-12-394311-8.00009-1 (2013).
- 384 El-Amraoui, A. & Petit, C. in *The cadherin superfamily : key regulators of animal development and physiology* (eds Shintaro T. Suzuki & Shinji Hirano) (Springer, 2016).
- 385 Sakaguchi, H., Tokita, J., Muller, U. & Kachar, B. Tip links in hair cells: molecular composition and role in hearing loss. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* **17**, 388-393, doi:10.1097/MOO.0b013e3283303472 (2009).
- 386 Pepermans, E. *The auditory mechano-electrical transduction machinery: components and interactions* PhD thesis, Université Pierre-et-Marie-Curie, (2014).
- 387 Pepermans, E. & Petit, C. The tip-link molecular complex of the auditory mechano-electrical transduction machinery. *Hear Res* **330**, 10-17, doi:10.1016/j.heares.2015.05.005 (2015).
- 388 Sahly, I. *et al.* Localization of Usher 1 proteins to the photoreceptor calyceal processes, which are absent from mice. *J Cell Biol* **199**, 381-399, doi:10.1083/jcb.201202012 (2012).
- 389 Sotomayor, M., Weihofen, W. A., Gaudet, R. & Corey, D. P. Structure of a force-conveying cadherin bond essential for inner-ear mechanotransduction. *Nature* **492**, 128-132, doi:10.1038/nature11590 (2012).
- 390 Michalski, N. & Petit, C. Genetics of auditory mechano-electrical transduction. *Pflugers Arch* **467**, 49-72, doi:10.1007/s00424-014-1552-9 (2015).
- 391 Takahashi, S. *et al.* Cadherin 23-C Regulates Microtubule Networks by Modifying CAMSAP3's Function. *Sci Rep* **6**, 28706, doi:10.1038/srep28706 (2016).
- 392 Zallocchi, M., Delimont, D., Meehan, D. T. & Cosgrove, D. Regulated vesicular trafficking of specific PCDH15 and VLRG1 variants in auditory hair cells. *J Neurosci* **32**, 13841-13859, doi:10.1523/JNEUROSCI.1242-12.2012 (2012).
- 393 Domanico, D., Fragiotta, S., Cutini, A., Grenga, P. L. & Vingolo, E. M. Psychosis, Mood and Behavioral Disorders in Usher Syndrome: Review of the Literature. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol* **4**, 50-55 (2015).
- 394 Hohman, T. J. *et al.* Discovery of gene-gene interactions across multiple independent data sets of late onset Alzheimer disease from the Alzheimer Disease Genetics Consortium. *Neurobiol Aging* **38**, 141-150, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.10.031 (2016).
- 395 Lord, J. & Cruchaga, C. The epigenetic landscape of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* **17**, 1138-1140, doi:10.1038/nn.3792 (2014).
- 396 Lord, J., Lu, A. J. & Cruchaga, C. Identification of rare variants in Alzheimer's disease. *Front Genet* **5**, 369, doi:10.3389/fgene.2014.00369 (2014).
- 397 Sorte, H. S., Gjevnik, E., Sponheim, E., Eiklid, K. L. & Rodningen, O. K. Copy number variation findings among 50 children and adolescents with autism spectrum disorder. *Psychiatr Genet* **23**, 61-69, doi:10.1097/YPG.0b013e32835d718b (2013).
- 398 Fromer, M. *et al.* De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature* **506**, 179-184, doi:10.1038/nature12929 (2014).
- 399 Noor, A. *et al.* Copy number variant study of bipolar disorder in Canadian and UK populations implicates synaptic genes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **165B**, 303-313, doi:10.1002/ajmg.b.32232 (2014).
- 400 Wu, C. C. *et al.* Identifying Children With Poor Cochlear Implantation Outcomes Using Massively Parallel Sequencing. *Medicine (Baltimore)* **94**, e1073, doi:10.1097/MD.0000000000001073 (2015).
- 401 Thomsen, E. R. *et al.* Fixed single-cell transcriptomic characterization of human radial glial diversity. *Nat Methods* **13**, 87-93, doi:10.1038/nmeth.3629 (2016).
- 402 McMillan, D. R. & White, P. C. in *Adhesion-GPCRs structure to function, Advances in experimental medicine and biology v 706* (eds Simon Yona & Martin Stacey) 1 online

- resource (xxi, 199 p.) (Springer Science+Business Media ; Landes Bioscience, New York Austin, Tex., 2010).
- 403 Nordstrom, K. J., Lagerstrom, M. C., Waller, L. M., Fredriksson, R. & Schioth, H. B. The Secretin GPCRs descended from the family of Adhesion GPCRs. *Mol Biol Evol* **26**, 71-84, doi:10.1093/molbev/msn228 (2009).
- 404 Scheel, H., Tomiuk, S. & Hofmann, K. A common protein interaction domain links two recently identified epilepsy genes. *Hum Mol Genet* **11**, 1757-1762 (2002).
- 405 Michalski, N. *Transduction mécano-électrique cochléaire : identification et caractérisation fonctionnelle de ses composants* PhD thesis, Université Pierre-et-Marie-Curie, (2008).
- 406 Yagi, H., Noguchi, Y., Kitamura, K. & Sato, M. Deficiency of Vlgr1 resulted in deafness and susceptibility to audiogenic seizures while the degree of hearing impairment was not correlated with seizure severity in C57BL/6- and 129-backcrossed lines of Vlgr1 knockout mice. *Neurosci Lett* **461**, 190-195, doi:10.1016/j.neulet.2009.06.012 (2009).
- 407 Yagi, H. *et al.* Vlgr1 is required for proper stereocilia maturation of cochlear hair cells. *Genes Cells* **12**, 235-250, doi:10.1111/j.1365-2443.2007.01046.x (2007).
- 408 Frings, H., Frings, M. & Kivert, A. (Journal of Mammalogy, 1951).
- 409 Skradski, S. L. *et al.* A novel gene causing a mendelian audiogenic mouse epilepsy. *Neuron* **31**, 537-544 (2001).
- 410 Skradski, S. L., White, H. S. & Ptacek, L. J. Genetic mapping of a locus (mass1) causing audiogenic seizures in mice. *Genomics* **49**, 188-192, doi:10.1006/geno.1998.5229 (1998).
- 411 Yagi, H. *et al.* Vlgr1 knockout mice show audiogenic seizure susceptibility. *J Neurochem* **92**, 191-202, doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02875.x (2005).
- 412 Libé-Philippot, B. *et al.* Auditory cortex interneuron development requires the cadherins operating mechano-electrical transduction. *accepted in PNAS on June 13th 2017* (2017).
- 413 Liu, X. *et al.* Detecting signatures of positive selection associated with musical aptitude in the human genome. *Sci Rep* **6**, 21198, doi:10.1038/srep21198 (2016).
- 414 Tamayo, M. L. *et al.* Neuroradiology and clinical aspects of Usher syndrome. *Clin Genet* **50**, 126-132 (1996).
- 415 Cohen-Salmon, M., El-Amraoui, A., Leibovici, M. & Petit, C. Otogelin: a glycoprotein specific to the acellular membranes of the inner ear. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14450-14455 (1997).
- 416 Verpy, E. *et al.* Stereocilin connects outer hair cell stereocilia to one another and to the tectorial membrane. *J Comp Neurol* **519**, 194-210, doi:10.1002/cne.22509 (2011).
- 417 Yariz, K. O. *et al.* Mutations in OTOGL, encoding the inner ear protein otogelin-like, cause moderate sensorineural hearing loss. *Am J Hum Genet* **91**, 872-882, doi:10.1016/j.ajhg.2012.09.011 (2012).
- 418 Glover, G., Mueller, K. P., Sollner, C., Neuhauss, S. C. & Nicolson, T. The Usher gene cadherin 23 is expressed in the zebrafish brain and a subset of retinal amacrine cells. *Mol Vis* **18**, 2309-2322 (2012).
- 419 Schlichting, K., Wilsch-Brauninger, M., Demontis, F. & Dahmann, C. Cadherin Cad99C is required for normal microvilli morphology in Drosophila follicle cells. *J Cell Sci* **119**, 1184-1195, doi:10.1242/jcs.02831 (2006).
- 420 Schietroma, C. *et al.* Usher syndrome type 1-associated cadherins shape the photoreceptor outer segment. *J Cell Biol*, doi:10.1083/jcb.201612030 (2017).
- 421 Chung, S. & Andrew, D. J. Cadherin 99C regulates apical expansion and cell rearrangement during epithelial tube elongation. *Development* **141**, 1950-1960, doi:10.1242/dev.104166 (2014).
- 422 Murcia, C. L. & Woychik, R. P. Expression of Pcdh15 in the inner ear, nervous system and various epithelia of the developing embryo. *Mech Dev* **105**, 163-166 (2001).
- 423 Sugahara, F., Murakami, Y., Pascual-Anaya, J. & Kuratani, S. Reconstructing the ancestral vertebrate brain. *Dev Growth Differ*, doi:10.1111/dgd.12347 (2017).
- 424 Tanaka, D. H., Oiwa, R., Sasaki, E. & Nakajima, K. Changes in cortical interneuron migration contribute to the evolution of the neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 8015-8020, doi:10.1073/pnas.1102153108 (2011).
- 425 Metin, C. *et al.* Conserved pattern of tangential neuronal migration during forebrain development. *Development* **134**, 2815-2827, doi:10.1242/dev.02869 (2007).
- 426 Rancz, E. A. *et al.* Widespread vestibular activation of the rodent cortex. *J Neurosci* **35**, 5926-5934, doi:10.1523/JNEUROSCI.1869-14.2015 (2015).
- 427 Kleijer, K. T., Zuko, A., Shimoda, Y., Watanabe, K. & Burbach, J. P. Contactin-5 expression during development and wiring of the thalamocortical system. *Neuroscience* **310**, 106-113, doi:10.1016/j.neuroscience.2015.09.039 (2015).

- 428 Hunnicutt, B. J. *et al.* A comprehensive excitatory input map of the striatum reveals novel
functional organization. *Elife* **5**, doi:10.7554/eLife.19103 (2016).
- 429 Goodyear, R. J., Forge, A., Legan, P. K. & Richardson, G. P. Asymmetric distribution of
cadherin 23 and protocadherin 15 in the kinocilial links of avian sensory hair cells. *J Comp
Neurol* **518**, 4288-4297, doi:10.1002/cne.22456 (2010).
- 430 Gendrel, A. V. *et al.* Developmental dynamics and disease potential of random monoallelic
gene expression. *Dev Cell* **28**, 366-380, doi:10.1016/j.devcel.2014.01.016 (2014).
- 431 Gregg, C., Zhang, J., Butler, J. E., Haig, D. & Dulac, C. Sex-specific parent-of-origin allelic
expression in the mouse brain. *Science* **329**, 682-685, doi:10.1126/science.1190831 (2010).
- 432 Faingold, C. L. Role of GABA abnormalities in the inferior colliculus pathophysiology -
audiogenic seizures. *Hear Res* **168**, 223-237 (2002).
- 433 Coleman, J. R., Thompson, K. C., Wilson, M. A. & Wilson, S. P. Audiogenic seizure activity
following HSV-1 GAD65 sense or antisense injection into inferior colliculus of Long-Evans rat.
Epilepsy Behav, doi:10.1016/j.yebeh.2016.08.024 (2016).
- 434 Vinogradova, L. V., Kuznetsova, G. D. & Coenen, A. M. Audiogenic seizures associated with a
cortical spreading depression wave suppress spike-wave discharges in rats. *Physiol Behav*
86, 554-558, doi:10.1016/j.physbeh.2005.08.017 (2005).
- 435 Sun, W. *et al.* Early age conductive hearing loss causes audiogenic seizure and hyperacusis
behavior. *Hear Res* **282**, 178-183, doi:10.1016/j.heares.2011.08.004 (2011).
- 436 Pierson, M. & Liebmann, S. L. Noise exposure-induced audiogenic seizure susceptibility in
Sprague-Dawley rats. *Epilepsy Res* **13**, 35-42 (1992).
- 437 Italiano, D. *et al.* Genetics of reflex seizures and epilepsies in humans and animals. *Epilepsy
Res* **121**, 47-54, doi:10.1016/j.epilepsyres.2016.01.010 (2016).
- 438 Baulac, S. *et al.* A rat model for LGI1-related epilepsies. *Hum Mol Genet* **21**, 3546-3557,
doi:10.1093/hmg/dds184 (2012).
- 439 Poletaeva, I., Surina, N. M., Kostina, Z. A., Perepelkina, O. V. & Fedotova, I. B. The
Krushinsky-Molodkina rat strain: The study of audiogenic epilepsy for 65years. *Epilepsy
Behav*, doi:10.1016/j.yebeh.2015.04.072 (2015).
- 440 Penny, J. E. *et al.* Cochlear morphology of the audiogenic-seizure susceptible (AGS) or
genetically epilepsy prone rat (GEPR). *Acta Otolaryngol* **95**, 1-12 (1983).
- 441 Faingold, C. L., Walsh, E. J., Maxwell, J. K. & Randall, M. E. Audiogenic seizure severity and
hearing deficits in the genetically epilepsy-prone rat. *Exp Neurol* **108**, 55-60 (1990).
- 442 Zhao, D. Y., Wu, X. R., Pei, Y. Q. & Zuo, Q. H. Long-term effects of febrile convulsion on
seizure susceptibility in P77PMC rat--resistant to acoustic stimuli but susceptible to kainate-
induced seizures. *Exp Neurol* **88**, 688-695 (1985).
- 443 Doretto, M. C. *et al.* Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar
audiogenic rat strain (WAR). *Behav Genet* **33**, 33-42 (2003).
- 444 Li, H. *et al.* Aberrant responses to acoustic stimuli in mice deficient for neural recognition
molecule NB-2. *Eur J Neurosci* **17**, 929-936 (2003).
- 445 Miyakawa, T. *et al.* Enhanced susceptibility of audiogenic seizures in Fyn-kinase deficient
mice. *Brain Res Mol Brain Res* **28**, 349-352 (1995).
- 446 Saunders, J. C., Bock, G. R., James, R. & Chen, C. S. Effects of priming for audiogenic
seizure on auditory evoked responses in the cochlear nucleus and inferior colliculus of BALB-c
mice. *Exp Neurol* **37**, 388-394 (1972).
- 447 Lints, C. E., Willott, J. F., Sze, P. Y. & Nenja, L. H. Inverse relationship between whole brain
monoamine levels and audiogenic seizure susceptibility in mice: failure to replicate.
Pharmacol Biochem Behav **12**, 385-388 (1980).
- 448 Schreiber, R. A., Lehmann, A., Ginsburg, B. E. & Fuller, J. L. Development of susceptibility to
audiogenic seizures in DBA/2J and Rb mice: toward a systematic nomenclature of audiogenic
seizure levels. *Behav Genet* **10**, 537-543 (1980).
- 449 Faingold, C. L., Randall, M. & Tupal, S. DBA/1 mice exhibit chronic susceptibility to audiogenic
seizures followed by sudden death associated with respiratory arrest. *Epilepsy Behav* **17**, 436-
440, doi:10.1016/j.yebeh.2010.02.007 (2010).
- 450 Charizopoulou, N. *et al.* Gipc3 mutations associated with audiogenic seizures and
sensorineural hearing loss in mouse and human. *Nat Commun* **2**, 201,
doi:10.1038/ncomms1200 (2011).
- 451 Rocha-Sanchez, S. M. *et al.* Mature mice lacking Rbl2/p130 gene have supernumerary inner
ear hair cells and supporting cells. *J Neurosci* **31**, 8883-8893, doi:10.1523/JNEUROSCI.5821-
10.2011 (2011).

- 452 Legan, P. K. *et al.* Three deaf mice: mouse models for TECTA-based human hereditary
deafness reveal domain-specific structural phenotypes in the tectorial membrane. *Hum Mol*
Genet **23**, 2551-2568, doi:10.1093/hmg/ddt646 (2014).
- 453 Mendus, D. *et al.* Thrombospondins 1 and 2 are important for afferent synapse formation and
function in the inner ear. *Eur J Neurosci* **39**, 1256-1267, doi:10.1111/ejn.12486 (2014).
- 454 Ng, L. *et al.* Audiogenic seizure susceptibility in thyroid hormone receptor beta-deficient mice.
Neuroreport **12**, 2359-2362 (2001).
- 455 Dettling, J. *et al.* Autonomous functions of murine thyroid hormone receptor TRalpha and
TRbeta in cochlear hair cells. *Mol Cell Endocrinol* **382**, 26-37, doi:10.1016/j.mce.2013.08.025
(2014).
- 456 Chen, L. & Toth, M. Fragile X mice develop sensory hyperreactivity to auditory stimuli.
Neuroscience **103**, 1043-1050 (2001).
- 457 Byrns, C. N., Pitts, M. W., Gilman, C. A., Hashimoto, A. C. & Berry, M. J. Mice lacking
selenoprotein P and selenocysteine lyase exhibit severe neurological dysfunction,
neurodegeneration, and audiogenic seizures. *J Biol Chem* **289**, 9662-9674,
doi:10.1074/jbc.M113.540682 (2014).
- 458 Brennan, T. J., Seeley, W. W., Kilgard, M., Schreiner, C. E. & Tecott, L. H. Sound-induced
seizures in serotonin 5-HT_{2c} receptor mutant mice. *Nat Genet* **16**, 387-390,
doi:10.1038/ng0897-387 (1997).
- 459 Carballosa-Gonzalez, M. M. *et al.* EEG characterization of audiogenic seizures in the hamster
strain GASH:Sal. *Epilepsy Res* **106**, 318-325, doi:10.1016/j.epilepsyres.2013.07.001 (2013).
- 460 Sanchez-Benito, D. *et al.* Morphofunctional alterations in the olivocochlear efferent system of
the genetic audiogenic seizure-prone hamster GASH:Sal. *Epilepsy Behav*,
doi:10.1016/j.yebeh.2016.05.040 (2016).
- 461 Nellhaus, G. Experimental epilepsy in rabbits; development of a strain susceptible to
audiogenic seizures. *Am J Physiol* **193**, 567-572 (1958).
- 462 Nunoya, T., Tajima, M. & Mizutani, M. A hereditary nervous disorder in Fayoumi chickens. *Lab*
Anim **17**, 298-302, doi:10.1258/002367783781062398 (1983).
- 463 Fadlallah, N. *Etude comparative des epilepsies reflexes audiogene et photogene chez le*
poulet fayoumi. Apports des chimeres neurales et role du tronc cerebral PhD thesis,
Université Pierre-et-Marie-Curie, (1997).
- 464 Hepper, P. G. & Shahidullah, B. S. Development of fetal hearing. *Arch Dis Child* **71**, F81-87
(1994).
- 465 Sanes, D. H. & Woolley, S. M. A behavioral framework to guide research on central auditory
development and plasticity. *Neuron* **72**, 912-929, doi:10.1016/j.neuron.2011.12.005 (2011).
- 466 Oswald, A. M. & Reyes, A. D. Development of inhibitory timescales in auditory cortex. *Cereb*
Cortex **21**, 1351-1361, doi:10.1093/cercor/bhq214 (2011).
- 467 Winer, J. A. & Schreiner, C. *The auditory cortex.* (Springer, 2011).
- 468 Paz, J. T. & Huguenard, J. R. Microcircuits and their interactions in epilepsy: is the focus out
of focus? *Nat Neurosci* **18**, 351-359, doi:10.1038/nn.3950 (2015).
- 469 Li, L. Y. *et al.* A feedforward inhibitory circuit mediates lateral refinement of sensory
representation in upper layer 2/3 of mouse primary auditory cortex. *J Neurosci* **34**, 13670-
13683, doi:10.1523/JNEUROSCI.1516-14.2014 (2014).
- 470 Li, L. Y. *et al.* Differential Receptive Field Properties of Parvalbumin and Somatostatin
Inhibitory Neurons in Mouse Auditory Cortex. *Cereb Cortex* **25**, 1782-1791,
doi:10.1093/cercor/bht417 (2015).
- 471 Seybold, B. A., Phillips, E. A., Schreiner, C. E. & Hasenstaub, A. R. Inhibitory Actions Unified
by Network Integration. *Neuron* **87**, 1181-1192, doi:10.1016/j.neuron.2015.09.013 (2015).
- 472 Chen, I. W., Helmchen, F. & Lutcke, H. Specific Early and Late Oddball-Evoked Responses in
Excitatory and Inhibitory Neurons of Mouse Auditory Cortex. *J Neurosci* **35**, 12560-12573,
doi:10.1523/JNEUROSCI.2240-15.2015 (2015).
- 473 Natan, R. G. *et al.* Complementary control of sensory adaptation by two types of cortical
interneurons. *Elife* **4**, doi:10.7554/eLife.09868 (2015).
- 474 Weible, A. P. *et al.* Perceptual gap detection is mediated by gap termination responses in
auditory cortex. *Curr Biol* **24**, 1447-1455, doi:10.1016/j.cub.2014.05.031 (2014).
- 475 de Villers-Sidani, E., Simpson, K. L., Lu, Y. F., Lin, R. C. & Merzenich, M. M. Manipulating
critical period closure across different sectors of the primary auditory cortex. *Nat Neurosci* **11**,
957-965, doi:10.1038/nn.2144 (2008).
- 476 Sanes, D. H. & Kotak, V. C. Developmental plasticity of auditory cortical inhibitory synapses.
Hear Res **279**, 140-148, doi:10.1016/j.heares.2011.03.015 (2011).

477 Lewis, D. A. Inhibitory neurons in human cortical circuits: substrate for cognitive dysfunction in
schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol* **26**, 22-26, doi:10.1016/j.conb.2013.11.003 (2014).

478 Gonzalez-Burgos, G., Cho, R. Y. & Lewis, D. A. Alterations in cortical network oscillations and
parvalbumin neurons in schizophrenia. *Biol Psychiatry* **77**, 1031-1040,
doi:10.1016/j.biopsych.2015.03.010 (2015).

479 Bastrup, J. & Larsen, P. H. Optimized CLARITY technique detects reduced parvalbumin
density in a genetic model of schizophrenia. *J Neurosci Methods* **283**, 23-32,
doi:10.1016/j.jneumeth.2017.03.011 (2017).

480 Malt, E. A., Juhasz, K., Malt, U. F. & Naumann, T. A Role for the Transcription Factor Nk2
Homeobox 1 in Schizophrenia: Convergent Evidence from Animal and Human Studies. *Front
Behav Neurosci* **10**, 59, doi:10.3389/fnbeh.2016.00059 (2016).

481 Houser, C. R. Do structural changes in GABA neurons give rise to the epileptic state? *Adv
Exp Med Biol* **813**, 151-160, doi:10.1007/978-94-017-8914-1_12 (2014).

482 Takano, T. Interneuron Dysfunction in Syndromic Autism: Recent Advances. *Dev Neurosci* **37**,
467-475, doi:10.1159/000434638 (2015).

483 Rapanelli, M., Frick, L. R. & Pittenger, C. The Role of Interneurons in Autism and Tourette
Syndrome. *Trends Neurosci*, doi:10.1016/j.tins.2017.05.004 (2017).

484 Ide, M. *et al.* Genetic association analyses of PHOX2B and ASCL1 in neuropsychiatric
disorders: evidence for association of ASCL1 with Parkinson's disease. *Hum Genet* **117**, 520-
527, doi:10.1007/s00439-005-1342-8 (2005).

485 Del Pino, I. *et al.* Erbb4 deletion from fast-spiking interneurons causes schizophrenia-like
phenotypes. *Neuron* **79**, 1152-1168, doi:10.1016/j.neuron.2013.07.010 (2013).

486 Muller, I., Caliskan, G. & Stork, O. The GAD65 knock out mouse - a model for GABAergic
processes in fear- and stress-induced psychopathology. *Genes Brain Behav* **14**, 37-45,
doi:10.1111/gbb.12188 (2015).

487 Collège des Enseignants de Neurologie. *Sémiologie des crises épileptiques*,
<[https://www.cen-neurologie.fr/premier-cycle/semiologie-analytique/syndrome-myogene-
myopathique/semiologie-crisis-epileptiques](https://www.cen-neurologie.fr/premier-cycle/semiologie-analytique/syndrome-myogene-myopathique/semiologie-crisis-epileptiques)> (2017).

488 Cheah, C. S. *et al.* Specific deletion of Nav1.1 sodium channels in inhibitory interneurons
causes seizures and premature death in a mouse model of Dravet syndrome. *Proc Natl Acad
Sci U S A* **109**, 14646-14651, doi:10.1073/pnas.1211591109 (2012).

489 Tan, G. H. *et al.* Neuregulin 1 represses limbic epileptogenesis through ErbB4 in parvalbumin-
expressing interneurons. *Nat Neurosci* **15**, 258-266, doi:10.1038/nn.3005 (2011).

490 Bozzi, Y., Casarosa, S. & Caleo, M. Epilepsy as a neurodevelopmental disorder. *Front
Psychiatry* **3**, 19, doi:10.3389/fpsy.2012.00019 (2012).

491 Cobos, I. *et al.* Mice lacking Dlx1 show subtype-specific loss of interneurons, reduced
inhibition and epilepsy. *Nat Neurosci* **8**, 1059-1068, doi:10.1038/nn1499 (2005).

492 He, L. J. *et al.* Conditional deletion of Mecp2 in parvalbumin-expressing GABAergic cells
results in the absence of critical period plasticity. *Nat Commun* **5**, 5036,
doi:10.1038/ncomms6036 (2014).

493 Dong, F. *et al.* Deletion of CTNBN1 in inhibitory circuitry contributes to autism-associated
behavioral defects. *Hum Mol Genet* **25**, 2738-2751, doi:10.1093/hmg/ddw131 (2016).

494 Selby, L., Zhang, C. & Sun, Q. Q. Major defects in neocortical GABAergic inhibitory circuits in
mice lacking the fragile X mental retardation protein. *Neurosci Lett* **412**, 227-232,
doi:10.1016/j.neulet.2006.11.062 (2007).

495 Nakao, K. & Nakazawa, K. Brain state-dependent abnormal LFP activity in the auditory cortex
of a schizophrenia mouse model. *Front Neurosci* **8**, 168, doi:10.3389/fnins.2014.00168 (2014).

496 Zenisek, R. *et al.* Auditory processing deficits in bipolar disorder with and without a history of
psychotic features. *Bipolar Disord* **17**, 769-780, doi:10.1111/bdi.12333 (2015).

497 Rotschafer, S. E. & Razak, K. A. Auditory processing in fragile x syndrome. *Front Cell
Neurosci* **8**, 19, doi:10.3389/fncel.2014.00019 (2014).

498 Anomal, R. F. *et al.* Impaired Processing in the Primary Auditory Cortex of an Animal Model of
Autism. *Front Syst Neurosci* **9**, 158, doi:10.3389/fnsys.2015.00158 (2015).

499 Shetty, A. K. & Upadhy, D. GABA-ergic cell therapy for epilepsy: Advances, limitations and
challenges. *Neurosci Biobehav Rev* **62**, 35-47, doi:10.1016/j.neubiorev.2015.12.014 (2016).

500 Yang, N. *et al.* Generation of pure GABAergic neurons by transcription factor programming.
Nat Methods, doi:10.1038/nmeth.4291 (2017).

501 Shetty, A. K. & Bates, A. Potential of GABA-ergic cell therapy for schizophrenia, neuropathic
pain, and Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Brain Res* **1638**, 74-87,
doi:10.1016/j.brainres.2015.09.019 (2016).

- 502 Hunt, R. F. & Baraban, S. C. Interneuron Transplantation as a Treatment for Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med* **5**, doi:10.1101/cshperspect.a022376 (2015).
- 503 Arber, C. & Li, M. Cortical interneurons from human pluripotent stem cells: prospects for neurological and psychiatric disease. *Front Cell Neurosci* **7**, 10, doi:10.3389/fncel.2013.00010 (2013).
- 504 Spatazza, J., Mancina Leon, W. R. & Alvarez-Buylla, A. Transplantation of GABAergic interneurons for cell-based therapy. *Prog Brain Res* **231**, 57-85, doi:10.1016/bs.pbr.2016.11.005 (2017).
- 505 Larimer, P., Spatazza, J., Stryker, M. P., Alvarez-Buylla, A. & Hasenstaub, A. R. Development and long-term integration of MGE-lineage cortical interneurons in the heterochronic environment. *J Neurophysiol*, jn 00096 02017, doi:10.1152/jn.00096.2017 (2017).
- 506 Voronova, A. *et al.* Migrating Interneurons Secrete Fractalkine to Promote Oligodendrocyte Formation in the Developing Mammalian Brain. *Neuron* **94**, 500-516 e509, doi:10.1016/j.neuron.2017.04.018 (2017).
- 507 Kral, A., Kronenberger, W. G., Pisoni, D. B. & O'Donoghue, G. M. Neurocognitive factors in sensory restoration of early deafness: a connectome model. *Lancet Neurol*, doi:10.1016/S1474-4422(16)00034-X (2016).
- 508 Hassan, B. A. & Hiesinger, P. R. Beyond Molecular Codes: Simple Rules to Wire Complex Brains. *Cell* **163**, 285-291, doi:10.1016/j.cell.2015.09.031 (2015).
- 509 Verpy, E. *et al.* Stereocilin-deficient mice reveal the origin of cochlear waveform distortions. *Nature* **456**, 255-258, doi:10.1038/nature07380 (2008).
- 510 Caberlotto, E. *et al.* Usher type 1G protein sans is a critical component of the tip-link complex, a structure controlling actin polymerization in stereocilia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 5825-5830, doi:10.1073/pnas.1017114108 (2011).
- 511 Simmler, M. C. *et al.* Targeted disruption of otog results in deafness and severe imbalance. *Nat Genet* **24**, 139-143, doi:10.1038/72793 (2000).
- 512 Etournay, R. *et al.* Cochlear outer hair cells undergo an apical circumference remodeling constrained by the hair bundle shape. *Development* **137**, 1373-1383, doi:10.1242/dev.045138 (2010).
- 513 Moller, A. R. & Jannetta, P. J. Interpretation of brainstem auditory evoked potentials: results from intracranial recordings in humans. *Scand Audiol* **12**, 125-133 (1983).
- 514 Avan, P., Buki, B. & Petit, C. Auditory distortions: origins and functions. *Physiol Rev* **93**, 1563-1619, doi:10.1152/physrev.00029.2012 (2013).
- 515 Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* **119**, 493-501 (1992).
- 516 de Chaumont, F. *et al.* Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat Methods* **9**, 690-696, doi:10.1038/nmeth.2075 (2012).
- 517 Gray, E. G. Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex. *Nature* **183**, 1592-1593 (1959).
- 518 Gupta, A., Wang, Y. & Markram, H. Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science* **287**, 273-278 (2000).

Etude du rôle de protéines apparentées aux cadhérines dans le développement des interneurons du cortex auditif

Résumé. L'éminence ganglionnaire médiale (MGE) produit la grande majorité des interneurons GABAergiques corticaux synthétisant la parvalbumine. Les neuroblastes issus de la MGE migrent sur une longue distance avant d'atteindre leur destination finale. A ce jour, on ne sait pas s'il existe des mécanismes moléculaires les guidant vers des régions corticales données. Je montre que deux protéines apparentées aux cadhérines, *cdhr23* et *cdhr15*, ont un rôle déterminant dans le développement d'interneurons du cortex auditif, et de manière spécifique. Chez la souris et le macaque, ces deux protéines sont co-synthétisées par des neuroblastes issus de la MGE pendant leur migration. Chez les souris déficientes pour *Cdhr23* ou *Cdhr15*, les neuroblastes synthétisant *cdhr15* ou *cdhr23* s'accumulent dans le télencéphale basal, ne parviennent pas à pénétrer dans le néocortex et présentent *in vitro* des défauts de polarité cellulaire. *Cdhr15* intervient dans la survie des précurseurs d'interneurons à parvalbumine pendant la première semaine postnatale. Les souris mutantes pour *Cdhr23* ou *Cdhr15* présentent à trois semaines un nombre réduit d'interneurons à parvalbumine dans leur cortex auditif mais pas dans les cortex avoisinants. Cette diminution est associée à une disposition aux crises audiogènes. Mes résultats indiquent que des précurseurs d'interneurons du cortex auditif sont équipés de protéines d'adhérence déterminantes pour leur migration et leur intégration dans le cortex auditif. Ils suggèrent l'existence d'un possible mécanisme moléculaire général fondé sur un « code d'adhérence » qui déterminerait les neuroblastes GABAergiques dès leur naissance à intégrer une aire corticale donnée.

mots-clefs : cadhérine-23 ; protocadhérine-15 ; interneurons à parvalbumine ; cortex auditif ; migration neuronale ; surdité

Study of the role of cadherin-related proteins in the development of auditory cortex interneurons

Abstract. The medial ganglionic eminence (MGE) gives rise to the majority of cortical GABAergic interneurons that synthesize parvalbumin. Neuroblasts born in the MGE undergo a long distance migration before reaching their final target. Up to now, it is unknown whether any molecular mechanism guides them to specific cortical regions. I show that two cadherin-related proteins, *cdhr23* and *cdhr15*, have a critical role in the development of interneurons of the auditory cortex, specifically. In mice and macaque, the two proteins are co-synthesized in neuroblasts from the MGE during their migration. In mouse mutants for *Cdhr23* or *Cdhr15*, neuroblasts synthesizing *cdhr15* or *cdhr23* accumulate in the basal telencephalon, fail to enter the neocortex and present *in vitro* cell polarity defects. *Cdhr15* is involved in the survival of parvalbumin interneuron precursors during the first postnatal week. Mutant mice for *Cdhr23* and *Cdhr15* show at three weeks a reduced number of parvalbumin interneurons in the mouse auditory cortex but not the neighbouring ones. This decrease is associated with a susceptibility to audiogenic seizures. My results reveal that interneuron precursors of the auditory cortex are endowed by specific adhesion proteins critically involved in their migration and integration in the auditory cortex. They suggest a possible general molecular mechanism based on an "adhesion code" that would determine GABAergic neuroblasts from their birth to a specific cortical region.

keywords: cadherin-23; protocadherin-15; parvalbumin interneurons; auditory cortex; neuronal migration; deafness